

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Einfluss des Multidrug Resistance Protein-1 auf die vaskuläre Funktion im Modell des
Streptozotocin-induzierten Diabetes der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Matthias Christian Wick

aus Ebermannstadt

Würzburg, August 2013

Referentenblatt

Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Widder

Koreferentin: Prof. Dr. C. Förster

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Mai 2014

Der Promovend ist Arzt.

MEINEN GROBELTERN

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Das Multidrug Resistance Protein-1	1
1.2 Glutathion	3
1.2.1 Glutathion und das Multidrug Resistance Protein-1	3
1.2.2 Der Stoffwechsel von Glutathion	4
1.2.3 Aufgaben von Glutathion	6
1.3 Oxidativer Stress	7
1.3.1 Herkunft der reaktiven Sauerstoffspezies.....	8
1.3.2 Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies	10
1.3.3 Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies	11
1.3.4 Die antioxidative Wirkung von Glutathion.....	12
1.4 Das Endothel	13
1.4.1 Aufgaben des Endothels.....	13
1.4.2 Stickstoffmonoxid.....	14
1.4.3 Endotheliale Dysfunktion	16
1.4.4 Herkunft reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen.....	17
1.5 Diabetes und oxidativer Stress	19
1.6 Zielsetzung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Studienprotokoll	22
2.1.1 Streptozotocin	22
2.1.2 Entnahme der Aorten.....	23
2.2 Organbad	24
2.3 Zellkultur	25
2.4 Bestimmung der vaskulären Konzentration von Superoxidanionen	26
2.5 Bestimmung der vaskulären Konzentration von Glutathion	27
2.6 Bestimmung der Konzentration von Wasserstoffperoxid	28
2.7 Statistische Auswertungen	29

3 Ergebnisse	30
3.1 Tierversuch.....	30
3.2 Vaskuläre Relaxationsfähigkeit	32
3.3 Vaskuläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies	34
3.3.1 Superoxidanion-Spiegel.....	34
3.3.2 Wasserstoffperoxid-Spiegel	35
3.4 Produktion von Superoxidanionen in vitro unter hoher Glukosebelastung	36
3.5 Glutathion-Spiegel	37
4 Diskussion	38
4.1 Tierversuch.....	38
4.2 Endotheliale Funktion	40
4.3 Reaktive Sauerstoffspezies in murinen Aorten	41
4.4 Vaskuläres Glutathion.....	42
5 Zusammenfassung.....	46
6 Anhang	48
6.1 Abbildungsverzeichnis	48
6.2 Abkürzungsverzeichnis	49
6.3 Literaturverzeichnis	51

1 Einleitung

1.1 Das Multidrug Resistance Protein-1

Das Multidrug Resistance Protein-1 (MRP-1) wurde 1992 von Cole et al. als ein Mitglied der Superfamilie der Adenosine Triphosphate (ATP)-Binding Cassette-Transporter (ABC-Transporter) beschrieben. Andere Proteine, die auch zu dieser Familie gezählt werden, sind in den energieabhängigen Transport einer Vielzahl von Molekülen über die Zellmembran hinweg involviert [1]. Später wurden weitere MRP-Proteine entdeckt und zu einer Familie zusammengefasst [2]. Inzwischen sind neun Mitglieder der MRP-Transporter-Familie beschrieben [3].

Der 190kDa schwere MRP-1-Transporter ist in vielen Geweben, wie beispielsweise der Lunge, dem Herz, den Nieren, in Muskelzellen, den Hoden und dem Endothel vorhanden. Weniger stark ausgeprägt ist der Transporter in Leber und Dünndarm zu finden [2, 3]. MRP-1 ist in polarisierten Zellen in der Plasmamembran an der basolateralen Seite lokalisiert [4]. Somit erfolgt der ATP-abhängige Transport der Substrate nicht in Richtung der luminalen Seite des Gewebes, sondern in Richtung der Basalmembran [5]. Dies steht im Gegensatz zu anderen Efflux-Transportern, wie dem MDR1/P-glycoprotein, MRP-2 und ABCG2 [6], welche Stoffe in Richtung Galle oder Darmlumen sezernieren und diese damit auf die endgültige Elimination vorbereiten [3].

Cole et. al. beschrieben MRP-1 bei der Untersuchung einer gegen Chemotherapeutika resistenten Zellreihe eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms [1]. In der Folge wurden weitere Funktionen des Transportproteins aufgedeckt. Neben der Induktion von Resistenzen gegenüber einer Reihe von Chemotherapeutika wie Anthracycline, Vincaalkaloide, Topoisomerase-Hemmstoffe und Methotrexat, transportiert MRP-1 strukturell unterschiedliche lipophile Anionen und Medikamente. Dies wird durch eine Senkung der intrazellulären Konzentration der Stoffe mittels erhöhtem Efflux erreicht [3, 5, 7, 8]. Bei mit MRP-1 transfizierten Zellen trat außerdem eine Resistenz gegenüber gewissen Schwermetallionen wie beispielsweise Arsen und Antimon auf [5]. Dies

schützt Zellen und Gewebe, in denen MRP-1 ausgebildet wird, vor den toxischen Effekten bestimmter Xeno- und Endobiotika. Somit hat MRP-1 eine wichtige Rolle in der Barrierefunktion und im Schutz bestimmter Gewebe inne [6]. Mäuse, denen das MRP-1 Protein fehlt, sind beispielsweise anfälliger gegenüber Chemotherapeutika wie Etoposid und sterben somit schon bei geringeren Etoposid-Dosen als Wildtyp-Mäuse [9, 10]. Außerdem hat MRP-1 eine Funktion bei der leukotrienmodulierten Immunantwort, da es für den Transport von Leukotrien C₄ (LTC₄) mit zuständig ist [6].

In vielen Geweben, welche die erste Abwehrlinie gegenüber Fremd- und Giftstoffen darstellen, besteht der primäre Abwehrmechanismus darin, die Stoffe zurück in das Lumen zu transportieren. MRP-1 allerdings transportiert seine Substrate in die entgegengesetzte Richtung. Deshalb wird vermutet, dass MRP-1 hier nicht die Aufgabe der Elimination, sondern die des Schutzes der spezialisierten, sensiblen Zellen gegenüber den Fremd- und Giftstoffen innehat [6]. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass MRP-1 in Zellen gefunden wurde, die stark proliferieren, wie beispielweise in hyperplastischen reaktiven Typ II Pneumozyten in der Lunge, Paneth-Zellen im Dünndarm oder hepatischen Vorläuferzellen bei schweren Leberschäden [6, 11-13]. Das Auftreten des MRP-1-Proteins in hepatischen Vorläuferzellen ist insofern interessant, da MRP-1 in normalen Leberzellen weniger ausgeprägt vorkommt [2, 11].

In Zellschichten, die eine Blut-Gewebe-Barriere darstellen, wie die Blut-Hirn-Schranke und der Plexus choroideus, sind die MRP-1-Transporter auch auf der apikalen Seite polarisierter Zellen [14] zu finden, so dass MRP-1 die Akkumulation von Toxinen im Gehirn verhindert [15], indem die Fremdstoffe in das Blut zurück transportiert werden. Ähnliches gilt für die Blut-Plazenta Schranke. Hier sind die MRP-1-Transporter so ausgerichtet, dass fetales Blut und Gewebe geschützt werden [16]. Im Hoden dienen die MRP-1-Proteine dem Schutz der Sertoli-Zellen und der sich entwickelnden Spermatozoen [6, 9, 17].

Die physiologische Funktion der Verteidigung gegen Xenobiotika und toxische Metabolite sowie deren Elimination kann MRP-1 deshalb ausführen, da es in vielen

Gewebe und auch Barrieregewebe vorkommt. MRP-1 kann die Substanzen sowohl unkonjugiert als auch konjugiert mit Glutathion (GSH) transportieren. Meist ist freies GSH noch als Co-Substrat für den Transport von unkonjugierten Substanzen notwendig. MRP-1 kann somit als eine ubiquitäre GSH-Konjugatpumpe bezeichnet werden. Neben GSH-Konjugaten transportiert MRP-1 auch Glucuronat- und Sulfat-Konjugate [3, 6, 18].

Die zelluläre Entgiftung, an welcher MRP-1, wie eben dargestellt, beteiligt ist, gliedert sich in vier Schritte. Die Phase 0 der Entgiftung besteht in der Aufnahme der toxischen Substanzen in Zellen. Die Phase 1 stellt die Biotransformation und Oxidation der Stoffe dar. Dies wird hauptsächlich durch P450-Enzyme und andere Oxidasen durchgeführt. Es schließt sich die Phase 2 an, in der die Konjugation mit anionischen Gruppen wie z.B. GSH erfolgt. In Phase 3 ist MRP-1 als einer von vielen Transportern direkt beteiligt, indem es die zur Elimination vorbereiteten Stoffe ATP-abhängig aus den Zellen ausgeschleust [6, 18].

1.2 Glutathion

1.2.1 Glutathion und das Multidrug Resistance Protein-1

Im Zuge der Aufklärung der Funktionen von MRP-1 nahm man zunächst an, dass der Transport von GSH-Konjugaten über MRP-1 zur Resistenz gegenüber bestimmter Chemotherapeutika führe. Allerdings fehlte der Nachweis, dass es solche Konjugate mit den entsprechenden Chemotherapeutika gibt. Deshalb besteht nun die Auffassung, dass GSH für den Transport vieler Stoffe benötigt wird, wobei eine Konjugation nicht stattfinden muss [18]. Durch die Verringerung des intrazellulären GSH-Gehaltes konnten Zellen wieder sensibel gegenüber Chemotherapeutika gemacht werden [19].

Neben dem Transport von GSH-Konjugaten und dem Co-Transport von Stoffen mit GSH werden bestimmte Substanzen, wie Estron-3-Sulfat, nur in Anwesenheit von reduziertem GSH transportiert, wobei GSH nicht als Konjugat oder als Co-Transport aus der Zelle transportiert wird [20]. Man geht deshalb davon aus, dass GSH hier eine Art allosterischen Effekt ausübt [3]. Reduziertes GSH alleine ist auch ein Substrat von MRP-1 [21], wobei es ein eher schlechtes Substrat für MRP-1

darstellt [6]. Der Transport von GSH wird aber von einigen Stoffen wie Verapamil, Arsenite und bestimmten Bioflavonoiden getriggert [22]. Oxidiertes Glutathion (Glutathion-Disulfid, GSSG), welches selbst nicht zellmembranpermeabel ist, wird durch MRP-1 aus der Zelle transportiert. Unter erhöhtem oxidativen Stress kommt es zu einem Anstieg des Exports von GSSG aus der Zelle [23-25]. (Siehe Abbildung 1)

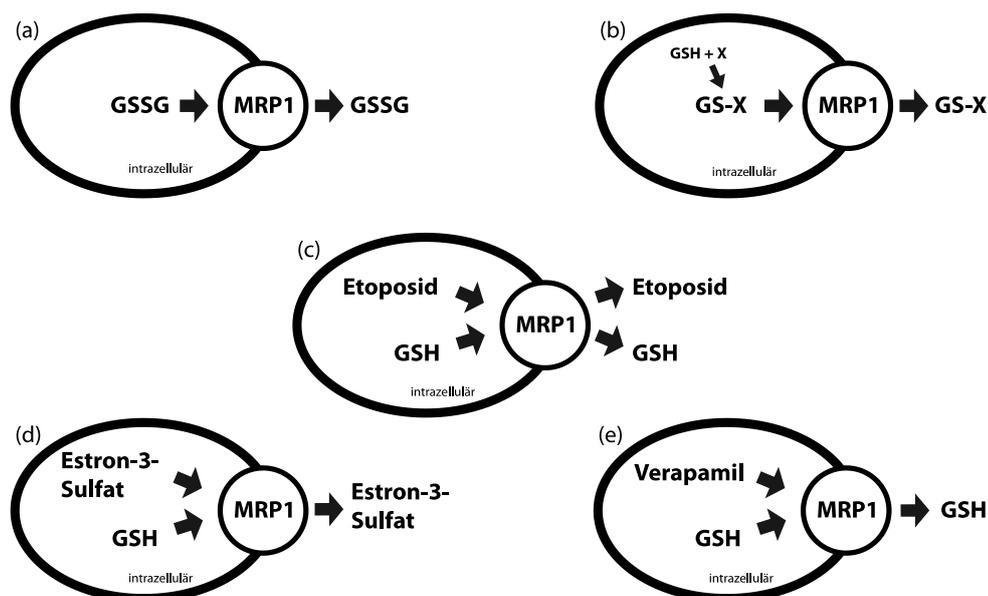


Abbildung 1: Zusammenhänge zwischen GSH und MRP-1 nach [18] und [3]. In dieser Abbildung sind die Zusammenhänge zwischen GSH und MRP-1 zusammengefasst: (a) Direkter Export von GSSG durch MRP-1, (b) Export von GSH-Konjugaten, (c) Co-Transport von Substanzen wie Etoposid mit GSH, (d) zeigt den allosterischen Effekt von GSH auf den Export bestimmter Substanzen, (e) verdeutlicht, dass auch andere Substanzen den Export von GSH beeinflussen können, ohne selbst exportiert zu werden.

Sowohl das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der GSH-Synthese, die γ -Glutamylcysteinsynthetase, als auch das MRP-1-Protein werden unter dem Einfluss von oxidativem Stress vermehrt gebildet [6, 25, 26].

1.2.2 Der Stoffwechsel von Glutathion

GSH (Abbildung 2), ist ein Tripeptid, bestehend aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin. Es ist ein bedeutendes Antioxidans und das wichtigste nicht-Protein Thiol [27] des menschlichen Organismus, dessen intrazelluläre Konzentration zwischen 0,5 und 10mmol/l liegt [28]. GSH liegt

hauptsächlich als reduziertes Thiol (> 98%) vor, aber auch in geringen Mengen als oxidiertes GSSG oder in anderen Thioester-Formen wie Thioether, Mercaptid oder ähnliche [29].

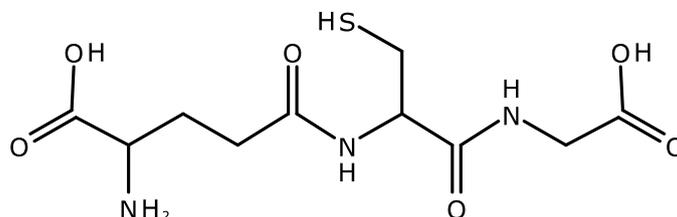


Abbildung 2: Strukturformel von Glutathion

Die Synthese von GSH findet im Zytosol jeder Körperzelle statt, wobei die Leber einen Hauptbildungsort darstellt. Die Herstellung von GSH erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt werden Cystein und Glutamat ATP-abhängig von der γ -Glutamylcystein-Synthetase zu γ -Glutamylcystein verbunden. In einem weiteren, ebenfalls ATP-abhängigen Syntheseschritt, fügt die Glutathionsynthetase noch Glycin hinzu. Es entsteht GSH. Die γ -Glutamylcystein-Synthetase stellt das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dar [27-29].

Nach der Synthese von GSH im Zytosol wird dieses in weiteren Zellkompartimenten, wie beispielsweise dem endoplasmatischen Retikulum oder den Mitochondrien, verteilt. In der Leber produziertes GSH wird außerdem zur Gallenproduktion in Richtung der Gallenwege sezerniert [30]. Außerdem gibt die Leber noch GSH in das Blut ab, damit dieses anderen Zellen des Organismus zur Verfügung steht [29].

Der Abbau von GSH erfolgt im Gegensatz zur Synthese nur extrazellulär und ausschließlich von Zellen, welche die γ -Glutamyltransferase ausbilden. Diese befindet sich auf der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran und kann neben dem Abbau von GSH unter physiologischen Bedingungen auch den Abbau von GSH-S-Konjugaten und GSH-Konjugaten einleiten [29].

Die Menge an GSH, die sich in einer Zelle befindet, ist von vielen Faktoren abhängig. Zu diesen gehören unter anderem die Anwesenheit von schweren Metallionen, hohe Konzentrationen an Glukose [31], die Exposition mit reaktiven

Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Stoffe, welche freie Radikale bilden können. Die intrazelluläre Menge an GSH ist vom Gleichgewicht zwischen Neusynthese und Verbrauch abhängig. Das mittels Konjugation verbrauchte GSH muss von der Zelle neu gebildet werden, wohingegen GSSG sowohl wieder zu GSH reduziert, als auch durch neues GSH ersetzt werden kann. Da das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der GSH-Biosynthese, die γ -Glutamylcystein-Synthetase, im Sinne einer negativen Rückkoppelung durch GSH inhibiert wird, kann ein Abfall der GSH-Konzentration die GSH-Synthese anregen. Neben dieser eher kurzfristigen Erhöhung der GSH-Biosynthese, besteht als längerfristiger Regulationsmechanismus die Möglichkeit der Neubildung dieser Enzyme [27].

1.2.3 Aufgaben von Glutathion

Die Aufgaben und Funktionen des GSH-Moleküls sind vielfältig. Hohe Mengen an intrazellulärem GSH sind für die antioxidative Abwehr von oxidativen Schäden, wie beispielweise der Reduktion von Wasserstoffperoxid notwendig [32]. Des Weiteren ist GSH am Leukotrienstoffwechsel [18] und an der Entgiftung von endogenen und exogenen Giftstoffen beteiligt [33]. Die Zellzyklusregulation [18] und die Expression mancher Gene [34] sind ebenfalls durch GSH beeinflusst. Sogar Zelltod, bzw. das Zellüberleben stehen in einem Zusammenhang mit GSH [29].

Viele Studien haben gezeigt, dass hohe intrazelluläre GSH-Level vor dem Zelltod bewahren können und niedrige GSH-Spiegel eher zum Zelltod führen [35]. Ein Mangel an GSH kann die Apoptose stimulieren, ohne dass andere Stimuli vorhanden sind [36]. Alleine die Abwesenheit von GSH kann zur Nekrose von Zellen, die sonst in die Apoptose gehen würden, führen. Zellen, die der Apoptose unterliegen, geben GSH an das extrazelluläre Milieu ab [22, 37].

Der wichtigste Bestandteil des GSH-Moleküls ist der Cysteinyl-Anteil, welcher die reaktive Thiol-Gruppe beinhaltet und GSH somit ermöglicht an Redoxreaktionen teilzunehmen [29]. Dies ist neben der Abwehr von oxidativem Stress auch wichtig bei der Elimination von Xeno- und Endobiotika. Für die Entgiftung potentieller Toxine stehen verschiedene Wege zur Verfügung. Wie bereits beschrieben, findet

in Phase 2 der Entgiftung die Konjugation mit beispielsweise GSH statt. Diese kann entweder spontan erfolgen oder durch GSH-S-Transferasen katalysiert werden. Ohne enzymatische Hilfe kann GSH auch Komplexe mit Metallen bilden. Zum Metabolismus von Metallionen lässt sich noch anfügen, dass GSH einer der vielseitigsten und am häufigsten vorkommenden metallbindenden Liganden ist und somit eine wichtige Rolle im Transport, in der Lagerung und im Metabolismus von Metallionen ausübt [29].

GSH als das führende Verteidigungsmittel gegenüber toxischen Sauerstoffradikalen ist für die Abwehr von oxidativem Stress notwendig. Bei Bedingungen, unter denen vermehrt freie Sauerstoffspezies entstehen, können diese, insbesondere das Wasserstoffperoxid, mit Hilfe von GSH und der GSH-Peroxidase reduziert werden. GSH wird dadurch zu GSSG oxidiert. GSSG kann mit Hilfe der GSH-Reduktase dann Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (NADPH)-abhängig wieder zu GSH reduziert werden. Somit wird ein kompletter Redoxkreislauf gebildet [29]. Das Redoxpaar GSSG/2GSH sorgt für das stark reduktive Milieu im Inneren der Zellen und bestimmt ihre antioxidative Kapazität [28].

1.3 Oxidativer Stress

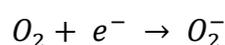
Alle biologischen Systeme enthalten Redoxelemente, wie beispielsweise das GSSG/2GSH-System, welche wichtige Rollen beispielsweise in den zellulären Signalwegen und der Zellhomöostase innehaben. Während oxidativer Stress lange als ein Zustand erhöhter Radikalspiegel mit demgegenüber mangelnder antioxidativer Kapazität beschrieben wurde, wird oxidativer Stress in neueren Modellen eher als eine Störung von Funktion und Homöostase der zellulären Redoxkreisläufe gesehen. Diese Beeinträchtigung kann beispielsweise durch Reaktionen mit den redoxsensitiven Thiolen, durch Veränderungen im Elektronentransport oder durch die Störung der Schlüsselenzyme der Redoxkreisläufe zustandekommen [38]. Reaktive Sauerstoffspezies haben hierbei eine zentrale Position inne [39]. Oxidativer Stress kann sowohl den Gesamtorganismus als auch einzelne Organe betreffen [40]. Alle aeroben

Organismen sind als Folge ihres aeroben Metabolismus physiologischerweise oxidativem Stress ausgesetzt. Im Zuge des oxidativen Metabolismus entstehen intermediäre Produkte wie Wasserstoffperoxid oder das Superoxidanion O_2^- . Diese führen zur Entstehung von weiteren toxischen Sauerstoffradikalen, welche dann zur Lipidperoxidation führen oder metabolische Prozesse stören können und somit die physiologische Funktion von Zellen beeinträchtigen oder diese beschädigen [29, 40].

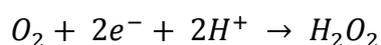
1.3.1 Herkunft der reaktiven Sauerstoffspezies

Sauerstoff ist in seiner ursprünglichen Form sehr wenig reaktiv. Damit Sauerstoff mit Biomolekülen reagieren kann, muss dieser aktiviert werden. Bei der Aktivierung entstehen reaktive Sauerstoffspezies, welche sowohl biologisch gewünscht als auch aggressiv oder toxisch reagieren können. Zur Aktivierung wird Sauerstoff reduziert. Die Reduktion kann in bis zu vier Reduktionsschritten bis zum Wasser erfolgen, wobei die Zwischenprodukte biophysikalisch meist nicht existent sind, sondern als Hydroperoxyl-Radikal HO_2 , Wasserstoffperoxid, OH-Radikal oder Wasser auftreten. Das Hydroperoxyl-Radikal ist die protonierte Form des Superoxidanions [40]. Reaktive Sauerstoffspezies haben, wie andere freie Radikale auch, ein freies, ungepaartes Elektron. Dieses ungepaarte Elektron gibt den reaktiven Sauerstoffspezies ihre große Reaktionsfähigkeit [41].

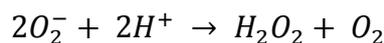
Die überwiegende Herkunft der reaktiven Sauerstoffspezies ist die Ein-Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff unter der Entstehung des Superoxidradikals [41].



Wasserstoffperoxid entsteht durch eine Reaktion von Sauerstoff mit zwei Elektronen und zwei Protonen.

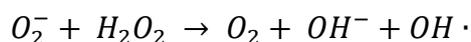


Häufig entsteht Wasserstoffperoxid auch über die vorübergehende Produktion des Superoxidanions. Zwei Superoxidanionen können dann zusammen Wasserstoffperoxid bilden.



Die Reaktion der Bildung von Wasserstoffperoxid aus zwei Superoxidanionen kann entweder spontan ablaufen oder wird durch die Superoxiddismutase katalysiert. Oxidasen können die direkte Entstehung von Wasserstoffperoxid katalysieren [40, 41].

Bei der direkten Reaktion des Superoxidanions mit Wasserstoffperoxid entsteht das reaktive Hydroxylradikal $OH\cdot$ [41].



Die Ursachen für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies sind vielfältig. Einerseits gibt es physikalische Erzeuger von reaktiven Sauerstoffspezies wie UV-Licht, Röntgenstrahlung oder Gammastrahlung. Neben der physikalischen Bildung entstehen reaktive Sauerstoffspezies in Zellen meist durch Reaktionen, die einen Elektronentransfer durchführen, wobei innerhalb der Zelle die Hauptproduktionsstätte für toxische Sauerstoffradikale die Mitochondrien beziehungsweise deren mitochondriale Elektronentransportsysteme sind [29, 40]. Diese Reaktionen können von Enzymen katalysiert werden oder auch nicht-enzymatisch ablaufen. Unter normalen Bedingungen entspringen die meisten reaktiven Sauerstoffderivate in Zellen durch das „Entweichen“ von Elektronen aus den Elektronentransportketten, wie sie beispielsweise in den Mitochondrien oder im endoplasmatischen Retikulum zu finden sind. Des Weiteren können reaktive Sauerstoffspezies durch Autooxidation reduzierter Stoffwechselzwischenprodukte entstehen. Autooxidativ sind beispielsweise Flavine, Thiole wie Glutathion, Hämoglobin und Komplexe von Übergangsmetallen. Übergangsmetallionen können autooxidative Prozesse beschleunigen. Sie sind aber meist gut abgeschirmt oder nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. In Nebenreaktionen vieler enzymatischer Umsetzungen können signifikante Mengen an Superoxidradikalen entstehen. Wichtige Nebenreaktionen sind Reaktionen, an welchen Cytochrom P450 beteiligt ist. Superoxidanionen entstehen hier direkt oder über die Bildung und Freisetzung spontan autooxidabler Semichinone. Die Superoxidanionbildung in der Atmungskette jedoch ist nur unter extremen Stoffwechselbedingungen und

bei vorgeschädigten Atmungskette-Komplexen von Bedeutung. Eine wichtige, physiologische Aufgabe von reaktiven Sauerstoffspezies trifft man beispielsweise bei der Betrachtung von neutrophilen Granulozyten an. Im Zuge der Abwehrfunktion kann durch diese Zellen der sogenannte Respiratory Burst durchgeführt werden. Hier wird, enzymvermittelt durch NADPH-Oxidasen, das Superoxidanion gebildet [28, 41, 42].

1.3.2 Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies

Es gibt eine Vielzahl von Schäden, welche von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht werden können, da sie Biomoleküle aller Art beeinträchtigen können [28]. Prinzipielle Schädigungsmechanismen sind die Schädigung lebenswichtiger Moleküle, Enzyme und Strukturen und auch die Schädigung von Regulatormolekülen [40]. An der DNA (Desoxyribonukleinsäure) kann es zu Strangbrüchen durch Modifikation der Desoxyribose kommen. Außerdem folgen Fehlpaarungen und Mutationen durch Zerstörung und Veränderung der verschiedenen Basen. Auch Proteine können durch reaktive Sauerstoffspezies geschädigt werden. Bestimmte Aminosäuren sind besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Zu diesen gehören Methionin, Histidin, Tryptophan und Cystein. Durch eine Reaktion mit diesen Aminosäuren kann es beispielsweise zu einer Veränderung der Tertiärstruktur oder des aktiven Zentrums der Enzyme kommen. Dies hat dann Auswirkungen auf die biologische Aktivität der Proteine. Kohlenhydrate wie Hyaluronsäure und Proteoglycane können ebenfalls geschädigt werden. Bei Membranlipiden sind vorzugsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren betroffen und unterliegen dann der Lipidperoxidation. Die Modifikation der Lipide führt zu einer Änderung deren chemischer Eigenschaften, was funktionelle Konsequenzen für die Zelle haben kann [28].

Das Superoxidanion hat eine besondere Rolle in der Toxizität der Sauerstoffderivate inne. Man kann dieses als den „Zentralpunkt“ des oxidativen Stresses bezeichnen, da vom Superoxidanion ausgehend andere reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal oder Singulett-Sauerstoff entstehen können. Diese, sowie das Superoxidanion sind an den Veränderungen an DNA, Proteinen und Lipiden beteiligt. Somit können in der

Folge entstehende Mutagenität, Karzinogenität, Enzymschädigungen, Membranschädigungen und die Schädigung wesentlicher Organellen auf diese reaktiven Sauerstoffspezies zurückgeführt werden [40].

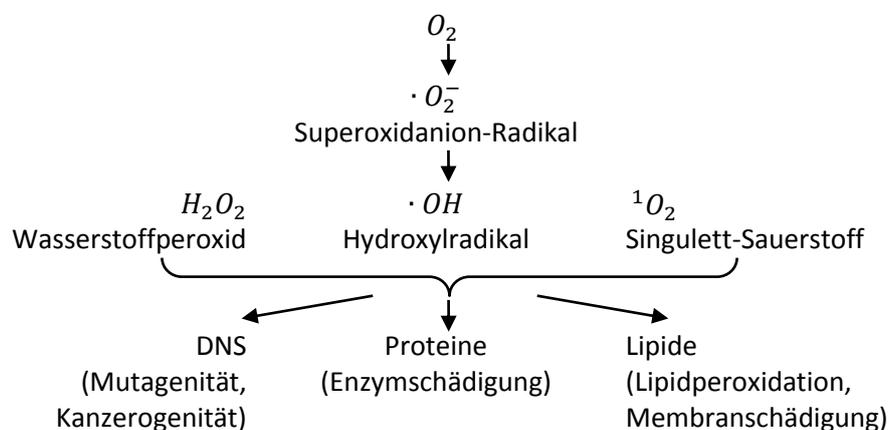


Abbildung 3: Superoxidanion als Ausgangspunkt oxidativer Schäden nach [40]. Die Abbildung verdeutlicht die zentrale Rolle des Superoxidanions bei oxidativem Stress. Vom Superoxidanion-Radikal aus werden die verschiedenen anderen Radikale, unter anderem Wasserstoffperoxid oder das Hydroxylradikal, gebildet. Diese sind dann in der Folge für die Schäden verantwortlich.

1.3.3 Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies

Die antioxidative Verteidigung setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Neben der Prävention der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt die Entgiftung über enzymatische und nicht-enzymatische Reaktionen. Als Beispiel einer Prävention kann man anführen, dass Nebenreaktionen sauerstoffabhängiger Metallenzyme möglichst zurückgedrängt werden. Die Cytochrom-C-Oxidase überspringt die Superoxid-Stufe, indem die O-O-Bindung des Sauerstoffs sofort gespalten wird. Zur Prävention zählen auch Vorgänge, welche reaktive Verbindungen abfangen bevor sie ein Elektron auf Sauerstoff übertragen können [28].

Wichtige, enzymatisch katalysierte Reaktionen zur Entfernung reaktiver Sauerstoffradikale werden von der Superoxiddismutase, der Katalase und der GSH-Peroxidase durchgeführt. Das von der Superoxiddismutase gebildete Wasserstoffperoxid kann sowohl von der Katalase als auch von der GSH-Peroxidase weiterverarbeitet werden [28].

Es existieren viele Möglichkeiten nicht-enzymatischer Entfernung reaktiver Sauerstoffradikale. Exemplarisch kann man Ascorbinsäure (Vitamin C) als ein wasserlösliches Antioxidans und α -Tocopherol (Vitamin E) als ein fettlösliches Antioxidans nennen [28].

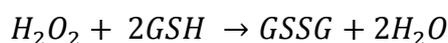
Neben der direkten Entfernung reaktiver Sauerstoffspezies sind auch Rekonstitutionssysteme, welche die verbrauchten Sauerstoffradikalfänger reaktivieren, und Reparatursysteme, welche schon beschädigte Strukturen reparieren oder aus dem Organismus entfernen, von Bedeutung [40].

Um eine ausreichende Schutzwirkung zu erzielen, werden verschiedene Kriterien genannt, welche zur erfolgreichen Ausübung der Schutzwirkung erfüllt sein müssen. Die Antioxidantien müssen in das entsprechende zelluläre Kompartiment gelangen, in welchem freie Radikale vorkommen oder gebildet werden. Außerdem müssen die Antioxidantien, da die Halbwertszeiten der reaktiven Sauerstoffspezies relativ kurz sind, zur richtigen Zeit am richtigen Ort sein. Das Radikalfängersystem muss eine, im Vergleich zur Schädigungswirkung günstige Reaktionskonstante zweiter Ordnung mit dem freien Radikal aufweisen, damit das System mit dem der Schädigung in Konkurrenz treten kann. Der Radikalfänger muss zuletzt auch in ausreichender Konzentration vorliegen [40].

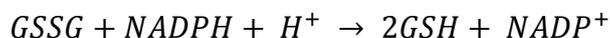
1.3.4 Die antioxidative Wirkung von Glutathion

GSH als wichtigstes intrazelluläres Thiol ist für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Redoxstatus zuständig [29]. Dieses Gleichgewicht ist, wie bereits dargestellt, für eine optimale Aktivität der meisten Enzyme und zellulären Makromoleküle notwendig. Zur Ausübung dieser Aufgabe ist die stark reduzierende Wirkung der Thiolgruppe notwendig. Diese kann leicht mit freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies reagieren [28].

GSH kann sowohl mit an Kohlenstoff assoziierten Radikalen nicht-enzymatisch [27], als auch enzymatisch, katalysiert durch die GSH-Peroxidase, mit Wasserstoffperoxid reagieren. GSH wird in dieser Reaktion zu GSSG oxidiert [28].



Das hierbei entstandene GSSG kann wieder regeneriert werden. Die GSH-Reduktase reduziert GSSG mit Hilfe von NADPH wieder zu GSH. Somit ist ein kompletter Redoxkreislauf gebildet [28].



Wenn GSH zum Schutz von Zellen verwendet wird, so werden entweder GSSG oder GSH-Konjugate gebildet [27]. Da das Redoxpaar GSSG/2GSH für das stark reduktive Milieu im Inneren der Zellen verantwortlich ist und ihre antioxidative Kapazität bestimmt [28], ist es wichtig, dass Zellen dieses sensible Gleichgewicht auch unter oxidativem Stress aufrechterhalten. Dazu können Zellen entweder GSH neu bilden oder den GSSG-Level modulieren. Dies kann einerseits mithilfe der GSH-Reduktase durch die Reduktion von GSSG geschehen, andererseits kann GSSG aus Zellen exportiert werden. Zellen oder Organe, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, geben GSSG ab [24, 25].

1.4 Das Endothel

1.4.1 Aufgaben des Endothels

Das Endothel, das größte Organ des menschlichen Körpers, besteht aus einer einzigen Zellschicht. Diese kleidet Blutgefäße von innen aus [43]. Seit der Entdeckung des „endothelial derived relaxing factor“ (EDRF) [44], welcher inzwischen auch als Stickstoffmonoxid (NO) bekannt ist, weiß man, dass das Endothel mehr als nur eine strukturelle Grenze ist. Das Endothel fungiert als ein direktes Verbindungsglied zwischen den Bestandteilen des zirkulierenden Blutes und reguliert eine Vielzahl von lokalen Funktionen der Blutgefäße wie den Gefäßtonus, die Koagulation und Entzündungsreaktionen. Dies geschieht sowohl durch verschiedene Mediatoren als auch durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Zu den Mediatoren gehören Stoffe wie NO und Prostacyclin, die eine Relaxation des Gefäßes verursachen und Faktoren, welche eine Kontraktion veranlassen. Zu den kontraktionsauslösenden Stoffen gehören Endothelin-1, Thromboxan A2 und reaktive Sauerstoffspezies [43, 45, 46]. Das im Endothel gebildete NO kann durch reaktive Sauerstoffspezies inaktiviert werden [47] und wird durch die Superoxiddismutase stabilisiert. Normalerweise herrscht

eine Balance zwischen den verschiedenen Faktoren. Ist dieses Gleichgewicht gestört, so kommt es leicht zu Vasokonstriktion, Leukozytenadhäsion und vaskulären Entzündungsreaktionen [43]. Dies führt zur endothelialen Dysfunktion.

1.4.2 Stickstoffmonoxid

Die Synthese von NO kann durch die drei verschiedenen Isoformen der NO-Synthase erfolgen. Diese sind die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I), induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II) und endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III) [48-51]. Die NO-Synthasen bilden Stickstoffmonoxyd aus L-Arginin. Dabei wird dieses oxidiert und es entstehen NO und L-Citrullin. Die Katalyse benötigt mehrere Co-Faktoren. Dazu gehören Calmodulin, Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Mononucleotid, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und NADPH. Die NO-Synthase ist ein Dimer, welches sich aus zwei Monomeren zusammensetzt. Im Endothel wird die Synthese hauptsächlich durch die eNOS durchgeführt. Die eNOS ist ein membranständiges Enzym. Man kann sie sowohl an der Plasmamembran als auch an den Membranen des Golgi-Apparates finden. Verschiedene Stimuli aktivieren die eNOS, zu denen sowohl Acetylcholin als auch auf das Endothel einwirkende Scher- und Zugkräfte gehören [52]. Durch Letzteres wird auch die Produktion des Co-Faktors Tetrahydrobiopterin angeregt [53].

Die Aufgaben von NO sind vielfältig. Es spielt eine Rolle bei der Neurotransmission, bei der Regulation der Transkription von Genen, der Ribonukleinsäure (RNA)-Translation, der Modifikation von Proteinen und bei der Aufrechterhaltung und Modulierung des Gefäßtonus. Dazu gehören auch die Inhibition von mehreren proatherosklerotischen Signalwegen, sowie die Inhibition der Aktivierung, Adhäsion und Migration von Monozyten und somit die Kontrolle vaskulärer Entzündungsreaktionen. Des Weiteren verhindert NO die Apoptose endothelialer Zellen [48, 54].

Eine der wichtigsten Aufgaben von NO ist die NO-vermittelte Vasodilatation. Dazu diffundiert das in den Endothelzellen gebildete NO in die glatten Muskelzellen und veranlasst dort durch die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Über cGMP wird dann die

Vasodilatation ausgelöst [48, 52, 55-59]. Bei einem Fehlen der NO-Synthase, also bei einem Fehlen von NO, entsteht in Versuchstieren Bluthochdruck [60, 61].

Eine verminderte Verfügbarkeit von NO führt somit zu einer Beeinträchtigung der endothelabhängigen Vasodilatation und kann Atherosklerose begünstigen. Die in der Gefäßwand produzierten reaktiven Sauerstoffspezies können die Verfügbarkeit von NO herabsetzen. Durch die Reaktion des Superoxidanions mit NO kann Peroxynitrit (ONOO^-) entstehen, wodurch NO inaktiviert wird. Peroxynitrit selbst wird auch zu den reaktiven Sauerstoffspezies gezählt. Peroxynitrit kann sehr leicht mit Proteinen, DNA und Lipiden reagieren. Außerdem kann es die eNOS beschädigen [48, 54, 62].

Unter physiologischen Bedingungen produziert die eNOS NO. Unter Abwesenheit von L-Arginin oder Tetrahydrobiopterin ist die endotheliale NO-Synthase jedoch nicht mehr in der Lage, Elektronen auf L-Arginin zu transferieren. Deshalb beginnt sie Sauerstoff als Substrat zu verwenden. Es entsteht das Superoxidanion. Peroxynitrit kann die eNOS so beschädigen, dass das für die NO-Bildung benötigte Dimer zerstört wird, und die einzelnen Teile nunmehr Superoxidanionen anstelle von NO produzieren. Unter diesen Bedingungen findet die sogenannte „Entkopplung“ der eNOS statt. Eine entkoppelte eNOS wurde schon in vielen pathologischen Situationen gefunden. Dazu gehören Diabetes, Hypercholesterinämie oder Hypertonie [54, 63-65].

Das zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehörende Wasserstoffperoxid kann die eNOS regulieren. Wasserstoffperoxid aktiviert diese und stimuliert längerfristig die Transkription der Gene dieses Enzyms. Allerdings kann eine erhöhte Bildung der eNOS unter oxidativem Stress zu einer paradoxen Situation führen, in der große Mengen an entkoppelten eNOS-Enzymen große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies produzieren können [63].

Für diabetische Stoffwechselbedingungen ist festzustellen, dass für endotheliale Zellen, welche mit hohen Glukosekonzentrationen behandelt wurden, sowohl eine Erhöhung, als auch eine verminderte Genexpression beschrieben wurde. Insulin

allerdings stimuliert unter physiologischen Bedingungen die NO-vermittelte Vasorelaxation [54].

1.4.3 Endotheliale Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion beschreibt eine bestimmte Verhaltensweise der Blutgefäße. Normalerweise relaxieren arterielle Gefäße, wenn sie Signale wie NO oder Prostacyclin vom Endothel erhalten. Im Zuge der endothelialen Dysfunktion ist diese endothelabhängige Entspannung bzw. Erweiterung der arteriellen Gefäße beeinträchtigt. Neben dieser funktionell leicht beobachtbaren Komponente schließt der Begriff der endothelialen Dysfunktion auch eine weitreichende Veränderung des Genprogramms des Endothels mit ein [54]. Im Zustand dieser Dysfunktion ist das Endothel nicht mehr in der Lage ausreichende Mengen an vasoaktivem NO zu bilden [48]. Die verringerte Bioaktivität kann mehrere Gründe haben. Es kann sowohl die NO-Synthase geringer exprimiert sein als auch die Substrate für die NO-Synthase fehlen oder NO durch reaktive Sauerstoffspezies inaktiviert sein [39]. Man nimmt an, dass die endotheliale Dysfunktion das Bindeglied zwischen den molekularen Vorgängen und der vaskulären Pathogenese vieler Erkrankungen darstellt [54, 66]. Die Schwere der endothelialen Dysfunktion kann außerdem als prognostischer Faktor für das Langzeitoutcome bei Patienten mit Herzinsuffizienz verwendet werden. Die Ausprägung der endothelialen Dysfunktion ist direkt mit der Mortalität der an Herzinsuffizienz leidenden Patienten assoziiert [67].

Insgesamt hat sich das Konzept der endothelialen Dysfunktion großteils etabliert, da diese ein funktioneller Parameter ist, der sowohl im Tierversuch als auch am Menschen gemessen werden kann [54, 66]. Mehrere wichtige Faktoren können die endothelabhängige Vasodilatation in Versuchen auslösen.

Acetylcholin, einer der beliebtesten Stoffe zur Auslösung der endothelabhängigen Vasodilatation in Versuchen, kann die Entspannung der Gefäße nur auslösen, wenn das Endothel intakt ist, beziehungsweise sich *in vitro* in nächster Nähe zum Gefäß befindet [44, 54]. Die Vasodilatation wird durch NO vermittelt [68], wobei

Acetylcholin über eine Erhöhung des Ca^{2+} /Calmodulin-Spiegels die eNOS aktiviert [48].

Der Fluss durch die Gefäße kann die endothelabhängige Vasodilatation ebenfalls stimulieren. Die mechanischen Kräfte eines erhöhten Blutflusses wirken als Scherkräfte auf das Endothel, wodurch eine Dilatation ausgelöst wird. Diese Erweiterung ist ebenfalls NO vermittelt [54]. Im Gegensatz zur acetylcholininduzierten Vasodilatation wird hier die Erweiterung der Gefäße nicht von Ca^{2+} vermittelt, es findet vielmehr eine Phosphorylierung und dadurch Aktivierung der eNOS statt [48, 69].

1.4.4 Herkunft reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen

Zu den wichtigen Quellen reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen gehören mitochondriale Enzymkomplexe wie die Elektronentransportkette, NADPH-Oxidasen, Xanthin-Oxidasen, die entkoppelte NO-Synthase und Cytochrom P450 Enzyme [39, 43, 70]. Die wichtige Rolle der entkoppelten eNOS ist im Abschnitt über NO genauer beschrieben.

Die oxidative Phosphorylierung ist eine der kritischsten Aufgaben der Mitochondrien. Zu diesem System gehören fünf große Multienzymkomplexe und die ATP-Synthase. Unter physiologischen Bedingungen und in den meisten Geweben ist dieses System eine wichtige Quelle reaktiver Sauerstoffspezies. Im Endothel jedoch, einem eher gering stoffwechselaktivem Gewebe, spielen reaktive Sauerstoffspezies, die aus den Mitochondrien entspringen, eine eher geringe Rolle [43].

Die Xanthin-Oxidase hat zwei Formen, Xanthin-Dehydrogenase und Xanthin-Oxidase, welche beide für den Purinstoffwechsel wichtig sind. Die Xanthin-Oxidase reduziert Sauerstoff, und die Xanthin Dehydrogenase kann entweder Sauerstoff oder Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) reduzieren. Durch die Reduktion von Sauerstoff können Superoxidanionen oder Wasserstoffperoxid entstehen [39]. Neben der Leber und dem Dünndarm kommt die Xanthinoxidase auch im Endothel [71] vor [43, 72].

Cytochrom-P450 Enzyme sind membrangebundene, Häm-enthaltende Oxidasen. Normalerweise sind diese Enzyme für die metabolische Aktivierung oder Inaktivierung von Vitaminen, Steroiden und vielen Medikamenten verantwortlich. Die meisten Cytochrom-P450 Enzyme sind in der Leber zu finden. Man findet sie aber auch im Herz und im Endothel [73]. Die Cytochromoxidasen in Gefäßen können sowohl Mediatoren erzeugen, die eine Vasodilatation auslösen, als auch reaktive Sauerstoffspezies bilden, welche dann vasokonstriktiv wirken. Die genaue Rolle der von Cytochrom-P450 Oxidasen gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies ist jedoch noch unklar [43].

Die NADPH-Oxidase ist ein Enzym, welches aus mehreren Untereinheiten besteht. Sie katalysiert die Produktion von Superoxidanionen durch die Reduktion von Sauerstoff unter Zuhilfenahme von NADPH beziehungsweise NADH als Elektronendonator. Die NADPH-Oxidase wurde zunächst in neutrophilen Granulozyten gefunden. Dort spielt sie eine wichtige Rolle beim „Oxidative Burst“ der unspezifischen Immunabwehr [43, 74].



Es wurde gezeigt, dass die NADPH-Oxidase in fast allen Zelltypen der Gefäße vorkommt [75]. Im kardiovaskulären Gewebe ist die Oxidase ein membranassoziiertes Protein. Im Vergleich zu den NADPH-Oxidasen der Granulozyten sind die Oxidasen der Gefäßzellen eher langsame Enzyme. Sie können im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten außerdem nur etwa ein Drittel der Superoxidanionen produzieren. Im Gegensatz dazu sind die NADPH-Oxidasen in den Gefäßzellen kontinuierlich aktiv [74, 76].

Die von den vaskulären NADPH-Oxidasen produzierten reaktiven Sauerstoffspezies sind wichtig für die Beeinflussung des vaskulären Zellwachstums, der vaskulären Migration, Proliferation und Aktivierung. Die physiologische NADPH-Oxidase ist außerdem für die Regulation des Gefäßtonus wichtig. Die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies können entweder direkt den Gefäßtonus beeinflussen oder diesen indirekt durch die Inaktivierung von NO zu Peroxynitrit beeinflussen [43].

1.5 Diabetes und oxidativer Stress

Unter allen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen sind Diabetes mellitus und Bluthochdruck die führenden Ursachen. Beide treten sehr häufig gemeinsam auf. Das Endothel ist hierbei der Hauptangriffspunkt dieser kardiovaskulären Risikofaktoren [62]. Oxidativer Stress spielt somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen [74].

Viele Daten zeigen, dass die endothelabhängige Relaxation von Gefäßen unter diabetischen Stoffwechselbedingungen beeinträchtigt ist [77-82]. Sowohl für den Typ 1-Diabetes [83] als auch für den Typ 2-Diabetes [84] wurde eine beeinträchtigte Vasodilatation beschrieben [54, 85, 86]. Dazu passend ist die endotheliale Dysfunktion sowohl mit akuter [87], als auch mit chronischer Hyperglykämie assoziiert [62]. Gleiches konnte bei klinisch manifestem Diabetes mellitus [86, 88] und bei experimentellem Diabetes [89] gezeigt werden. Auch bei gesunden Individuen kann die endotheliale Dysfunktion durch Infusion von Glukose ausgelöst werden [90]. Das Korrelat der beeinträchtigten endothelabhängigen Vasodilatation, erhöhte Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies, wurde sowohl bei experimentellem Diabetes als auch bei Patienten gefunden [43].

Die endotheliale Dysfunktion bei Diabetes kann darauf zurückgeführt werden, dass die Produktion von vasodilatatorischen und vasokonstriktiven Substanzen verändert ist. Die Bioverfügbarkeit von NO [91] und Prostacyclin ist herabgesetzt, wohingegen Thromboxan und andere Vasokonstriktoren vermehrt gebildet werden [54]. Es sind erhöhte Level an reaktiven Sauerstoffspezies vorhanden [92]. Diese bedingen eine herabgesetzte Bioverfügbarkeit und Inaktivierung von NO und somit die endotheliale Dysfunktion [43, 54]. Ursache hierfür scheint die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies durch NADPH-Oxidasen und entkoppelte eNOS zu sein [62, 93, 94].

Die NADPH-Oxidase und die entkoppelte eNOS sind Enzyme, welche bei Diabetes reaktive Sauerstoffradikale produzieren können [91]. Es besteht weiterhin ein Zusammenhang zwischen Hyperglykämie, oxidativem Stress und der Aktivierung

von NADPH-Oxidasen [62]. Werden Endothelzellen direkt hyperglykämischen Bedingungen ausgesetzt, so resultiert daraus eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [43, 92]. Diese Zellen zeigen außerdem eine erhöhte Expression der eNOS und der NADPH-Oxidase-Untereinheiten [95].

Die endothelabhängige Relaxation der Gefäße, also die NO-vermittelte Vasodilatation, ist beeinträchtigt, wenn die Abwehrsysteme gegen oxidativen Stress reduziert sind. Die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion ist nicht auf eine Minderproduktion von NO zurückzuführen, sondern auf eine funktionelle Zerstörung von NO durch Superoxidanionen [96]. Die Balance zwischen dem Superoxidanion und NO ist somit wichtig für die normale Funktion des Endothels [75].

Zusammen mit NO dienen die reaktiven Sauerstoffspezies als Initiatoren von intrazellulären Signalen, da sie reversible, posttranslationale Proteinmodifikationen hervorrufen können. Unter pathologischen Bedingungen führen erhöhte Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies allerdings zu endothelialer Dysfunktion, einer beeinträchtigten vaskulären Relaxation, erhöhtem Wachstum (Hypertrophie und Hyperplasie) von vaskulären glatten Muskelzellen und zu einer vermehrten Ablagerung von Matrixproteinen [62].

Bei niedrigen Superoxidanion-Spiegeln bleibt NO funktionell aktiv, wohingegen bei erhöhten Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies nicht nur NO zerstört wird, sondern auch andere Proteine durch die entstehenden Metabolite oxidiert werden [62].

Bei Diabetes mellitus sind erhöhte Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies in der Gefäßwand zu finden, welche eine der bedeutenden Ursachen für diese endotheliale Dysfunktion darstellen. Im Endothel sind besonders die NADPH-Oxidase und die entkoppelte eNOS für die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich [91, 97, 98]. Die Endothelzellen zeigen eine stärkere Anfälligkeit gegenüber der Erhöhung des Glukosespiegels. Im Gegensatz zu anderen Körperzellen haben sie keine Möglichkeit ihre Glukoseaufnahme zu begrenzen [99]. Die reaktiven Sauerstoffspezies, wie beispielsweise das

Superoxidanion oder Wasserstoffperoxid, können im Endothel mit der Hilfe von GSH entgiftet werden [25].

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von MRP-1 auf die vaskuläre Funktion bei Diabetes näher darzustellen. Dazu wurde der Einfluss von MRP-1 auf den Redoxstatus endothelialer Zellen in-vitro und im Tiermodell betrachtet. Zudem wurde anhand von MRP-1^{-/-}-Mäusen die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit unter oxidativem Stress bei Diabetes bestimmt.

2 Material und Methoden

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Pipetten und Verbrauchsmaterialien, wie Pipettenspitzen und Safe-Lock-Tubes, stammten von Eppendorf (Hamburg, Deutschland).

2.1 Studienprotokoll

Für den Tierversuch wurden zwölf Wochen alte, männliche MRP-1^{-/-}-Mäuse (FVB.129P2-Abcc1atm1Bor N12 - zur Verfügung gestellt von P. Borst, The Netherland Cancer Institute) und männliche FVB-Mäuse (FVB/N) als Wildtyp-Kontrolltiere verwendet. Die Versuchstiere wurden in vier Gruppen randomisiert: FVB-Kontrolltiere mit und ohne (Sham) Diabetes und MRP-1^{-/-}-Mäuse mit und ohne (Sham) Diabetes. Diabetes wurde durch die Injektion von Streptozotocin (STZ) induziert. Dazu wurden 50mg STZ pro kg Körpergewicht für 5 Tage injiziert und der Blutzucker kontrolliert. Tiere, die zunächst nicht auf die STZ-Injektion ansprachen, wurden nachinjiziert. Ein Glukosespiegel von mehr als 250mg/dl wurde als diabetisch angesehen. Die Kontrolle des Blutzuckerspiegels erfolgte mit Hilfe eines handelsüblichen Blutzuckermessgerätes (Ascensia Elite; Bayer-Vital, Leverkusen, Deutschland).

Acht Wochen nach STZ-Injektion erfolgte die Entnahme der Aorten zur Untersuchung der vaskulären Kontraktilität.

2.1.1 Streptozotocin

STZ (Abbildung 4) ist ein Nitroso-Harnstoff-Derivat und wurde zunächst aus dem *Streptomyces achromogenes* isoliert. Bereits in den 1960er Jahren wurde entdeckt, dass STZ unter anderem bei Nagetieren Diabetes auslösen kann [100, 101]. STZ hat außerdem die Eigenschaften eines Breitspektrumantibiotikums und antineoplastische Eigenschaften [102], da es zu den alkylierenden Substanzen [103] gezählt werden kann [104].

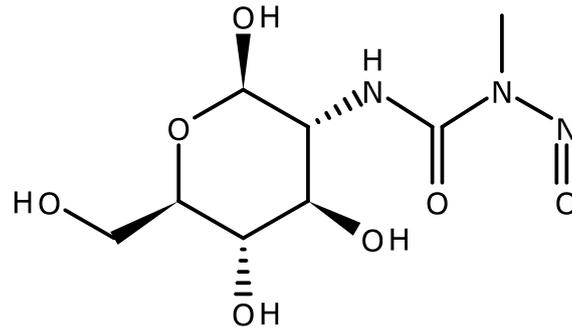


Abbildung 4: Strukturformel von Streptozotocin nach [105]

Bereits eine einzige hohe Dosis STZ kann in Nagetieren Diabetes auslösen. Dies geschieht vermutlich direkt aufgrund der toxischen Effekte. Alternativ kann man die Dosis, wie im Studienprotokoll beschrieben, auf mehrere einzelne kleine Dosen aufteilen [104].

Die toxische Wirkung gegenüber den β -Zellen wird dadurch erreicht, dass STZ über den GLUT2-Glukose-Transporter [106, 107] in die Zellen transportiert und damit angereichert wird. In den β -Zellen der Pankreasinseln wirkt STZ mittels seiner alkylierenden Eigenschaften unter Alkylierung der DNA [108] und den darauffolgenden Strangbrüchen toxisch. Folglich kommt es zu einer Nekrose der β -Zellen, und ein insulinpflichtiger Diabetes mellitus Typ I entsteht [103].

2.1.2 Entnahme der Aorten

Acht Wochen nach erfolgreicher STZ-Injektion wurden die Mäuse mittels Isofluran tief narkotisiert. Zur Entnahme der Aorten wurde der Bauchraum der Tiere auf Höhe des Zwerchfells eröffnet und die Lungen abgehoben. Danach wurde aus dem Herz Blut entnommen und das Herz entfernt. Anschließend konnte die Aorta vorsichtig freipräpariert werden. Diese wurde anschließend mithilfe eines Mikroskops noch vom restlichen, die Aorta umgebenden, Fettgewebe befreit. Nun wurden entweder direkt die Organbadversuche zur Bestimmung der vaskulären Kontraktilität durchgeführt oder die Gefäße bei -80°C eingefroren.

2.2 Organbad

Zur Untersuchung der Kontraktionsfähigkeit der thorakalen Aorta der Versuchstiere wurde ein Organbad der Firma Föhr Medical Instruments (Seeheim, Deutschland) verwendet. Das Volumen der Organbäder betrug 5ml. Diese wurden, ebenso wie die Austauschlösung, durch Wärmeschlangen auf 37°C erhitzt und die Temperatur wurde bei konstant 37°C gehalten. Während der Versuche und der Vorbereitung der Aorten im Organbad befanden sich diese durchgehend in einer mit 95% O₂/5% CO₂ begasten Krebslösung, welche durch die Begasung einen konstanten pH von 7,4 hatte. Eine Pumpe, welche ein gleichzeitiges Absaugen und wieder Hinzufügen von Krebslösung gewährleistete, war nötig, damit die Segmente während eines Austausches der Krebslösung immer von Flüssigkeit umspült waren. Die Austauschlösung wurde ebenfalls kontinuierlich mit 95% O₂/5% CO₂ begast. Die im Organbad vorhandenen Kraftaufnehmer (Grass FT03c) wurden an einen handelsüblichen Computer angeschlossen. Das Programm Vitrodat® sorgte für die unterbrechungsfreie Aufzeichnung der isometrischen Kontraktionskraft der Aortensegmente.

Vor dem Aufziehen der Aorten wurden diese in 3-4mm große Ringsegmente geschnitten. Anschließend folgte das sorgfältige Aufziehen dieser Aortenringe der thorakalen Mosaorta auf die Kraftaufnehmer. Diese wurden mit einem Zug von 1g passiv eingestellt. Darauf folgte unter dieser Ruhespannung eine Adaptationsphase von 30 Minuten. Nach deren Abschluss wurden die Aortenabschnitte so lange mit 100mmol/l KCl behandelt, bis eine reproduzierbare Kontraktion erreicht wurde.

Krebslösung in mmol/l:

NaCl 118,3; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 2,5 K₂HPO₄ 1,2; NaHCO₃ 25; Glukose 11,1; EDTACa, 0.026;

Vor den Untersuchungen der Aortensegmente wurden diese mit Prostaglandin 2α (3 x 10⁻⁷ – 3 x 10⁻⁶M), PGF2α, vorkontrahiert, sodass sich die Segmente in einem vergleichbaren Zustand an Vorkontraktion befanden.

Es wurden die Relaxationsantworten auf steigende Konzentrationen (zwischen $1 \times 10^{-9}\text{M}$ und $1 \times 10^{-5}\text{M}$) von Acetylcholin und dem NO-Donor DEA-NONOate untersucht. Acetylcholin diente zur Untersuchung der endothelabhängigen Relaxation und der NO-Donor DEA-NONOate zur Bestimmung der endothelunabhängigen Relaxation. Vor jedem Relaxations-Versuch wurden die Aortensegmente mittels Prostaglandin 2α ($3 \times 10^{-7} - 3 \times 10^{-6}\text{M}$), auf vergleichbare Werte vorkontrahiert. Zusätzlich wurden die Gefäße zwischen den einzelnen Dosiswirkungskurven drei Mal mit frischen Krebs-Puffer gewaschen und eine Regenerationsphase von 30 Minuten zugestanden [109-113].

2.3 Zellkultur

Es wurden humane Aorten Endothelzellen (HAEC's, Cambrex, San Diego, USA) zwischen den Passagen vier und acht verwendet. Diese wurden in EBM2-Medium (EBM2 Bullet Kit; Cambrex) entweder auf 6-Well Platten (657160, Gewebekulturplatte 6-Well, Tc-plate 6-well steril, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) oder in T-75-Flaschen (658175, Gewebekulturflasche steril, 250ml 75cm², Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ und $5,0\% \pm 0,1\% \text{CO}_2$. (Inkubator: Hera Cell 150, Thermo Scientific, Waltham, USA).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Zellen zunächst entweder mit Small interfering RNA (siRNA) gegen MRP-1 oder mit negativer siRNA transfiziert. Diese wurden dann unter normalen Bedingungen oder unter hohen Glukosekonzentrationen (30mmol/l) für fünf Tage inkubiert.

Die Transfektion der Zellen wurde bei einer 80%-igen Konfluenz der Zellen durchgeführt.

Dazu wurden spezifische siRNAs mithilfe des „Silincer small interfering RNA construction kit“ (Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) für humanes MRP-1 (AAT TCT CAA TGG GAT CAA AGT) produziert. Ebenso wurde eine negative siRNA-Kontroll-Sequenz (Ambion, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Die siRNA wurde zur Behandlung der HAECs zunächst in Eppendorf-Tubes vorinkubiert. Diese wurde dann in einer Konzentration von 25nMol/l auf die sich in 6-Well-Platten befindenden Zellen gegeben. Pro Well ergaben sich somit folgende Mengen: 0,5µl (50µM) MRP-1-siRNA/Negativ-siRNA + 996,5µl OptiMEM (31985, Invitrogen, Carlsbad, USA) + 3µl Oligofectamin (12252-011, Invitrogen, Carlsbad, USA) Nach vier Stunden Inkubationszeit (bei 37°C, 5% CO₂) wurden auf die Wells noch weitere 2ml EMB2-Medium gegeben. Nach 48 Stunden erfolgte eine Retransfektion. Während dieser Zeit wurde das Medium nicht gewechselt [25].

2.4 Bestimmung der vaskulären Konzentration von Superoxidanionen

Zur Bestimmung der vaskulären Konzentration von Superoxidanionen wurde eine Dihydroethidium (DHE)-basierte High performance liquid chromatography (HPLC)-Methode angewandt [114]. Nach der Entnahme der Aorten (Siehe 2.1.2) wurden diese in jeweils 5 ca. 2mm große Segmente geteilt. Diese wurden anschließend für ca. 20 Minuten bei 37°C in 1,5ml Hepes-Lösung mit DHE mit einer Konzentration von 10µmol/l, vor Lichteinflüssen geschützt, inkubiert. Es folgte eine Waschung mit Hepes-Puffer sowie die Homogenisierung der Proben in 200µl Kaffee-Säure-Lösung. Das so erhaltene Gemisch wurde bei 20160 G und 4°C für 12 Minuten zentrifugiert (Universal 32R, Hettrich, Tuttlingen, Deutschland). Die anschließende Filtration des Überstandes erfolgte mit einem Acrodisc CR Syringe-Filter (4mm). Die durch Zentrifugation erhaltenen Pellets wurden für die Proteinbestimmung in 300µl NaOH gelöst.

10x Hepes-Puffer:

47ml Hepes 1M (Hepes, free acid Ultrol 1M solution, Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 38,559g NaCl 132mM, 4,725g Glukose 5,0mM, 1,5g KCl 4,0mM, 0,495g MgCl₂ 0,49mM, 0,735g CaCl₂ 1,0mM, 500ml aqua dest.; pH 7,4 bei 37°C mit NaOH; Lagerung bei -80°C

Kaffeensäure-Lösung

4µl Kaffeensäure (10ng/ml) Lösung (3,4-Dihydroxymzimtsäure, Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 10ml 100%Methanol; Lagerung bei 4°C.

DHE-Lösung:

30ml 1xHEPES-Puffer, 12µl DHE (25mM) (Dihydroethidium, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

Zur Durchführung der HPLC wurde eine C-18-Umkehrphasen-Säule (Nucleosil 250, 4,5 mm Säulendurchmesser, 5 µm Partikeldurchmesser; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. Die mobile Phase setzte sich folgendermaßen zusammen: 30mg/l Oktansulfonat + 85%(w/v) Phosphorsäure, 7g/l NaH₂PO₄ mit einem pH von 2,7 + 35% (v/v) Acetonitril. Vor der Verwendung der mobilen Phase erfolgte eine Filtration mittels eines 0,45µm Filters (Millipore, Billerica, MA, USA) und eine Vakuumentgasung. Die Flussrate in der Säule betrug konstante 0,9ml/min. Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2-Dihydroethidium wurde elektrochemisch nachgewiesen. Es wurde die Analysezelle ESA 5011 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) verwendet. Die Elektroden der Analysezelle wurden auf 0,00V und +0,35V eingestellt.

Zur Wartung und zur Pflege des System wurde dieses mit Methanol und destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser gefüllt [115-117].

2.5 Bestimmung der vaskulären Konzentration von Glutathion

Zur Bestimmung der vaskulären Konzentration von GSH wurde eine elektrochemische HPLC-Methode angewandt.

Nach der Entnahme der Aorten (Abschnitt 2.1.2) wurden diese in jeweils 5 ca. 2mm große Segmente geteilt. Die zusammengehörenden Segmente wurden anschließen in jeweils 150µl, mit Eis gekühltem, HClO₄ homogenisiert. Die Konzentration von HClO₄ betrug 0,5M. Das dadurch erhaltene Gemisch wurde bei

10000G und 4°C für 10min zentrifugiert (Universal 32R, Hettrich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde für die HPLC verwendet.

Für die Bestimmung der vaskulären Konzentration von GSH wurde eine HPLC mit isograder Elution durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,75ml/min. Als Säule wurde eine C-18-Säule (Z226181 - Nucleosil® HPLC Column, Supelco, 4,6mm Säulendurchmesser, 25cm Säulenlänge, 5µm Partikeldurchmesser; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet. Die mobile Phase setzte sich folgendermaßen zusammen: 0,675mM Oktansulfonat + 30mM NaH₂PO₄ mit einem pH von 2,7 + 3% (v/v) Acetonitrl.

Die Bestimmung von GSH erfolgte elektrochemisch. Dazu wurde die ESA Coulochem II (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) mit einer Analysezelle 5040 (Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA) verwendet. Die Analysezelle war mit einer Brom-Diamanten-Elektrode ausgestattet. Das eingestellte Potential betrug 1500mV.

2.6 Bestimmung der Konzentration von Wasserstoffperoxid

Zur Bestimmung der vaskulären Konzentration von Wasserstoffperoxid wurde das „Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit“ von Invitrogen (Invitrogen, Paisley PA4 9RF, UK) verwendet.

Das Prinzip der Bestimmung der Menge an Wasserstoffperoxid besteht darin, dass das Amplex® Red Reagenz mit Wasserstoffperoxid reagiert. Dazu wird in diesem Ansatz die HRP-Peroxidase (Horseradish - Meerrettich Peroxidase) als Reaktionsenzym verwendet. In einer 1:1-Reaktion entsteht Resorufin, ein fluoreszierender Stoff. Dieser hat sein Erregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 571nm und ein Emissionsmaximum bei 585nm [118].

Das Vorgehen entsprach dem vom Hersteller des Amplex® Red Assays angegebenen Protokoll [119]. Die Vorbereitung der Aorten ist in Abschnitt 2.4 beschrieben.

Zur Messung der Fluoreszenz wurde der 96-well Synergy HT Mikroplattenleser der Firma Biotek (Biotek, Winooski, VT, USA) verwendet.

Zur Normalisierung der Proben und zur Bestimmung der in den Proben enthaltenen Proteinmenge wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

2.7 Statistische Auswertungen

Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler (mean \pm SEM) angegeben. Vergleiche zwischen einzelnen Tier- oder Versuchsgruppen wurden mithilfe eines „one-way ANOVA-Tests“ durchgeführt. Die statistische Analyse der verschiedenen Dosis-Antwort-Kurven der Organbadversuche wurde ebenfalls mittels eines „one-way ANOVA-Tests“ durchgeführt. Zeigte sich eine Signifikanz im ANOVA-Test, so wurde der „Student-Newman-Keuls post hoc-Test“ zur Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Gruppen verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Tierversuch

Das Körpergewicht acht Wochen nach den STZ- bzw. Sham-Injektionen wurde mit dem Ausgangsgewicht vor der Injektion verglichen (Abbildung 5). Hier zeigte sich, dass es zu einer weiteren Gewichtszunahme der Versuchstiere der Sham-Gruppen kam. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen Tieren der FVB- und der MRP-1^{-/-}-Gruppe.

STZ-induzierter Diabetes jedoch führte bei beiden Gruppen zu keiner weiteren Gewichtszunahme. Die Versuchstiere verloren sogar an Gewicht. Beim Vergleich der diabetischen FVB- und der diabetischen MRP-1^{-/-}-Gruppe zeigte sich keine signifikante Differenz in der Gewichtsabnahme.

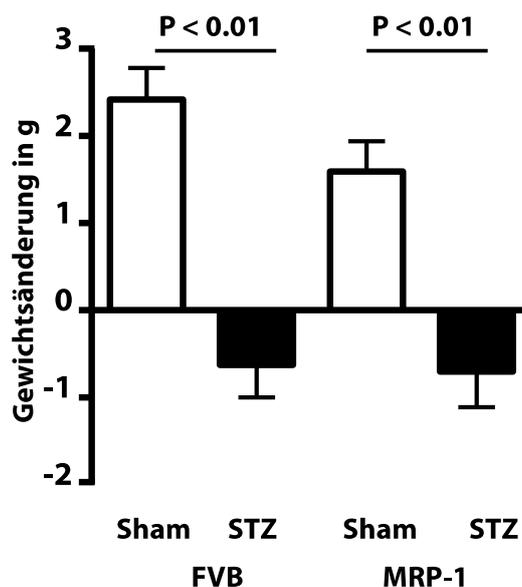


Abbildung 5: Gewichtsänderung der Versuchstiere Gewichtsänderung in g der FVB und MRP-1^{-/-} Mäuse acht Wochen nach durch STZ-Injektionen induziertem Diabetes oder nach Sham-Injektionen. Mean ± SEM, n = 30-35.

Zum Zeitpunkt der STZ- oder Sham-Injektionen hatten alle Versuchstiere vergleichbare Blutzuckerspiegel. Ebenfalls nach acht Wochen wurden die Blutzuckerkonzentrationen der vier verschiedenen Versuchsgruppen verglichen (Abbildung 6).

Nach den Injektionen hatten die Tiere der Sham-Gruppen (FVB- und MRP-1^{-/-}-Gruppe) allesamt vergleichbare Blutzuckerwerte. Diese unterschieden sich nicht von den Werten vor der Injektion.

STZ-Injektionen jedoch führten, wie erwartet, zu erhöhten Blutzuckerwerten in den Versuchstieren beider STZ-Gruppen. Vergleicht man beide diabetischen Gruppen, so kommt es zu einer vergleichbaren Zunahme der Glukosewerte der FVB- und der MRP-1^{-/-}-STZ-Gruppe.

Verglichen mit den Kontrolltieren war jeweils ein signifikanter Anstieg der Blutglukose zu verzeichnen.

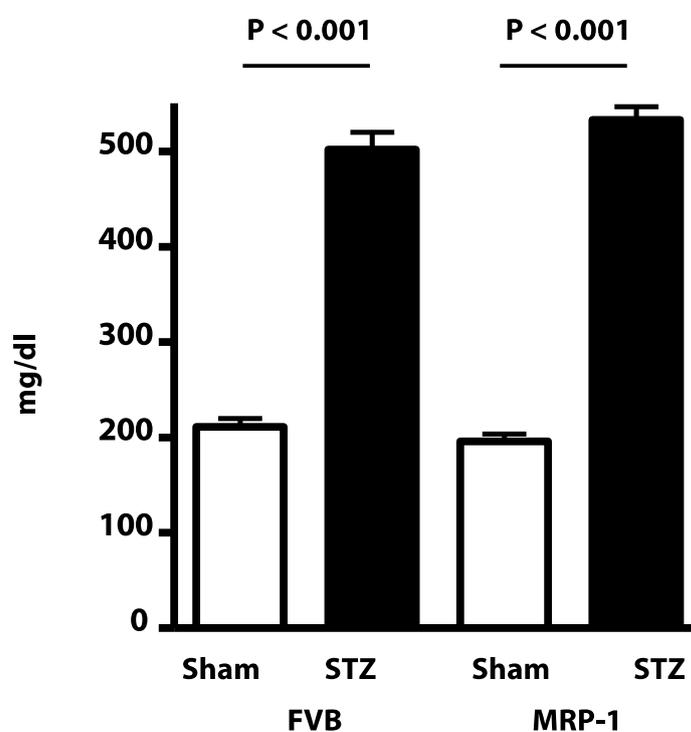


Abbildung 6: Blutzuckerspiegel der Versuchstiere Blutzuckerspiegel in mg/dl der FVB und MRP-1^{-/-} Mäuse acht Wochen nach durch STZ-Injektionen induziertem Diabetes oder nach Sham-Injektionen. Mean \pm SEM, n = 30-35.

3.2 Vaskuläre Relaxationsfähigkeit

Die vaskuläre Relaxationsfähigkeit der Aorten der Versuchstiere wurde acht Wochen nach erfolgreicher Induktion von Diabetes mittels STZ mithilfe eines Organbades getestet.

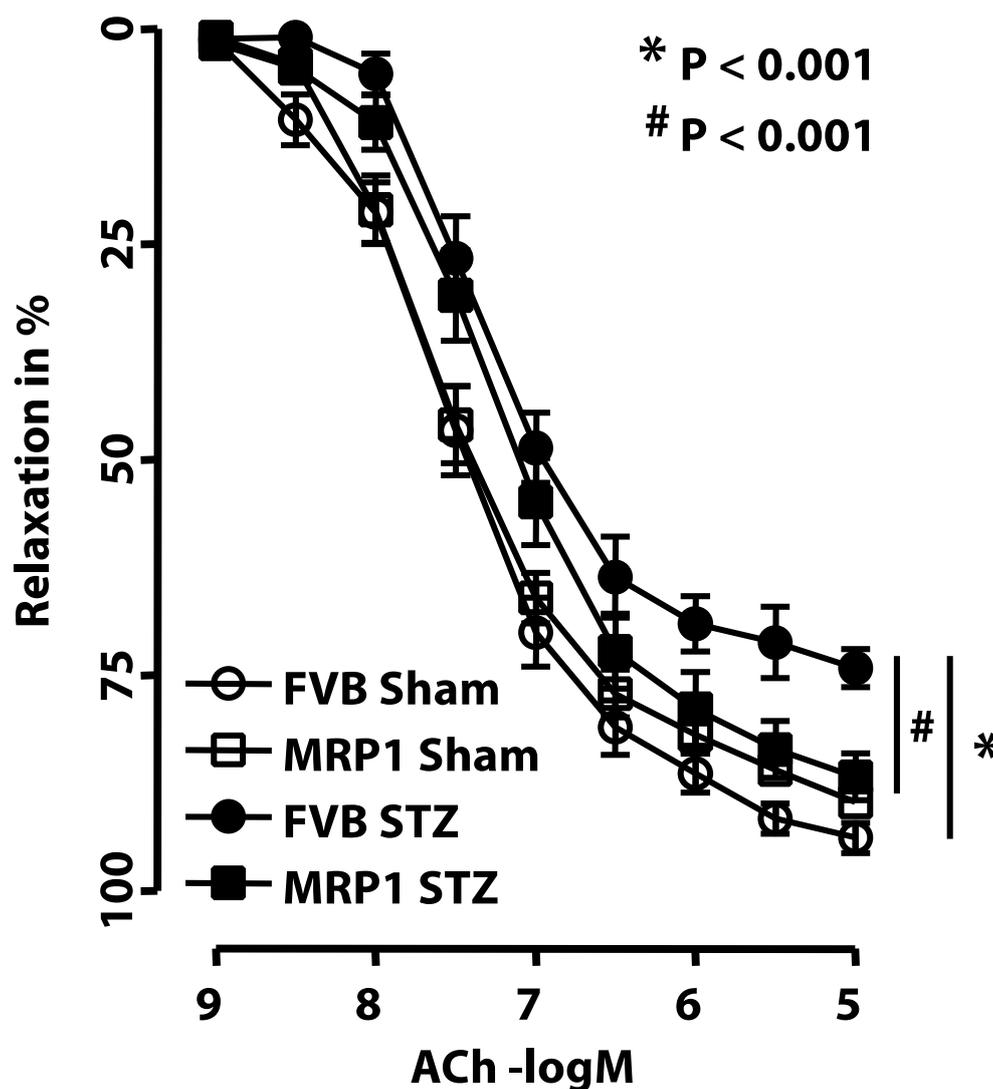


Abbildung 7: Endothelabhängige, Acetylcholin vermittelte Vasorelaxation Die Relaxationsfähigkeit ist in % zur Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ angegeben. Mean \pm SEM, n = 6-10.

Es gab keine signifikanten Unterschiede der Vasorelaxation zwischen den beiden nicht-diabetischen Versuchsgruppen, FVB-Sham und MRP-1^{-/-}-Sham. Jedoch kam es zu einer signifikant verminderten endothelabhängigen Vasorelaxation in der diabetischen Wildtyp-(FVB)-Gruppe (Abbildung 7). Im Gegensatz dazu kam es zu

keiner signifikanten Beeinträchtigung der acetylcholinvermittelten Vasorelaxation der diabetischen MPR-1^{-/-}-(STZ)-Gruppe.

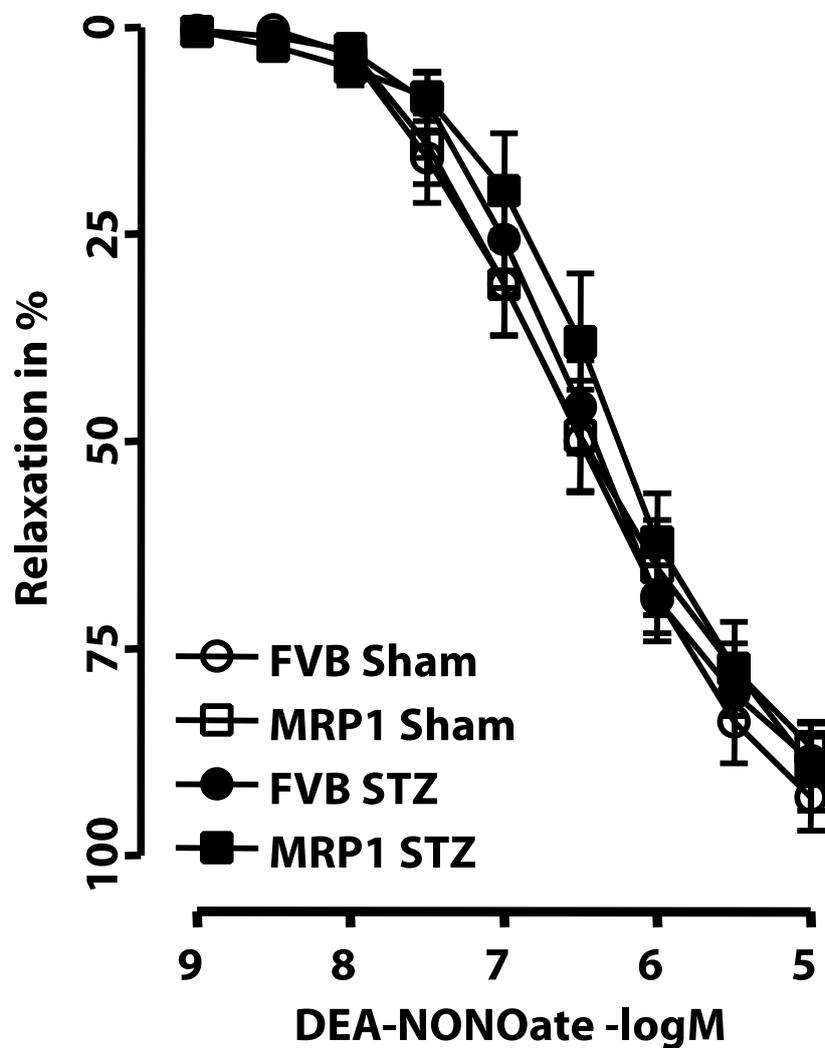


Abbildung 8: Endothelunabhängige, DEA-NONOate vermittelte Vasorelaxation. Die Relaxationsfähigkeit ist in % zur Vorkontraktion mit $PGF_{2\alpha}$ angegeben. Mean \pm SEM, n = 6-10.

Die endothelunabhängige Vasorelaxation mittels DEA-NONOate zwischen den vier verschiedenen Versuchsgruppen war nicht unterschiedlich (Abbildung 8).

3.3 Vaskuläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

3.3.1 Superoxidanion-Spiegel

Die Superoxidanion-Bildung wurde durch die Umwandlung von Dihydroethidium nach 2-Hydroxyethidium mittels HPLC gemessen. Die Entnahme der Gefäße erfolgte acht Wochen nach erfolgreicher Induktion von Diabetes durch STZ-Injektionen.

Nicht-diabetische Wildtyp-FVB-Tiere und nicht-diabetische MRP-1^{-/-}-Mäuse zeigten keine unterschiedliche Produktion von Superoxidanionen.

STZ induzierter Diabetes führte zu einer signifikanten Erhöhung der Produktion von Superoxidanionen in den Aorten der Wildtyp-FVB-Tiere (Abbildung 9) im Vergleich zu den Sham-FVB-Kontrolltieren. Diabetes hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Produktion von Superoxidanionen in der Versuchsgruppe der diabetischen MRP-1^{-/-}-Tiere.

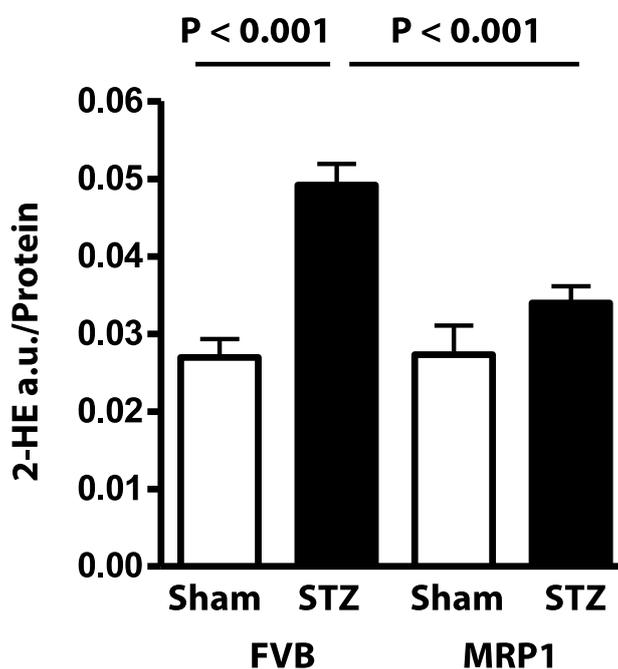


Abbildung 9: Aortale Produktion von Superoxidanionen gemessen mittels DHE-HPLC, in FVB- und MRP-1^{-/-}-Mäusen acht Wochen nach STZ-induziertem Diabetes oder Sham-Injektionen. Mean ± SEM, n = 6-10.

3.3.2 Wasserstoffperoxid-Spiegel

Die Wasserstoffperoxidproduktion war nicht unterschiedlich zwischen nicht-diabetischen FVB und MRP-1 Tieren. Ebenso wie bei der Produktion von Superoxidanionen zeigten sich bei diabetischen Wildtyp-Tieren im Vergleich zu nicht-diabetischen Wildtyp-Tieren signifikant erhöhte Wasserstoffperoxidwerte. Diabetes führte jedoch auch hier nicht zu einer Erhöhung der Produktion von Wasserstoffperoxid bei diabetischen MRP-1^{-/-}-Tieren (Abbildung 10).

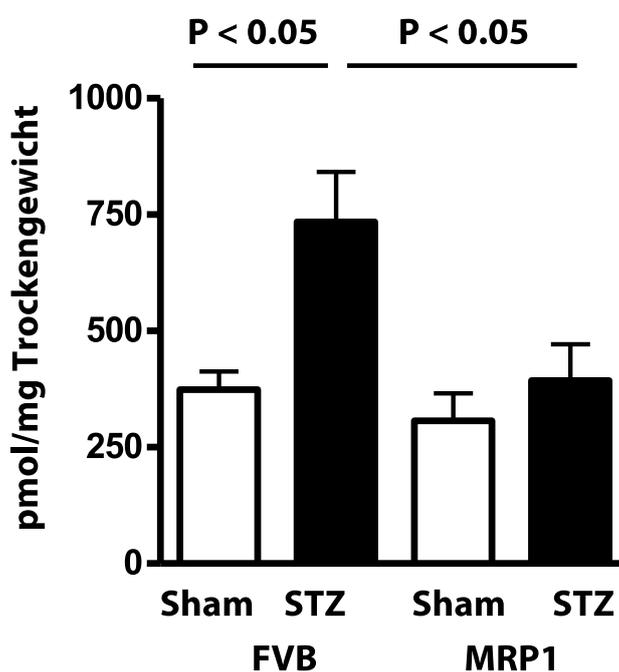


Abbildung 10: Aortale Wasserstoffperoxid-Spiegel, gemessen mithilfe des „Amplex® Red Hydrogen Reoxide/Peroxidase Assay Kit“, in FVB- und MRP-1^{-/-}-Mäusen acht Wochen nach STZ-induziertem Diabetes oder nach Sham-Injektionen. Mean ± SEM, n = 6-10

3.4 Produktion von Superoxidanionen in vitro unter hoher Glukosebelastung

Es fanden sich vergleichbare Mengen an Superoxidanionen in den beiden Gruppen (neg siRNA und MRP-1-siRNA) unter normaler Glukosekonzentration. Glukosekonzentrationen von 30mmol/l führten in der Gruppe der mit negativer siRNA transfizierten Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der Produktion von Superoxidanionen. Bei mit MRP-1 siRNA transfizierten Zellen, welche unter 30mmol/l Glukose für fünf Tage inkubiert wurden ergab sich jedoch keine Erhöhung des Superoxidanionen-Spiegels. Die Spiegel waren im Vergleich zur negativen siRNA 30mmol/l-Gruppe signifikant erniedrigt und auf dem gleichen Niveau, verglichen mit den Zellen, welche unter normalen Glukosebedingungen (5mmol/l) gehalten wurden (Abbildung 11).

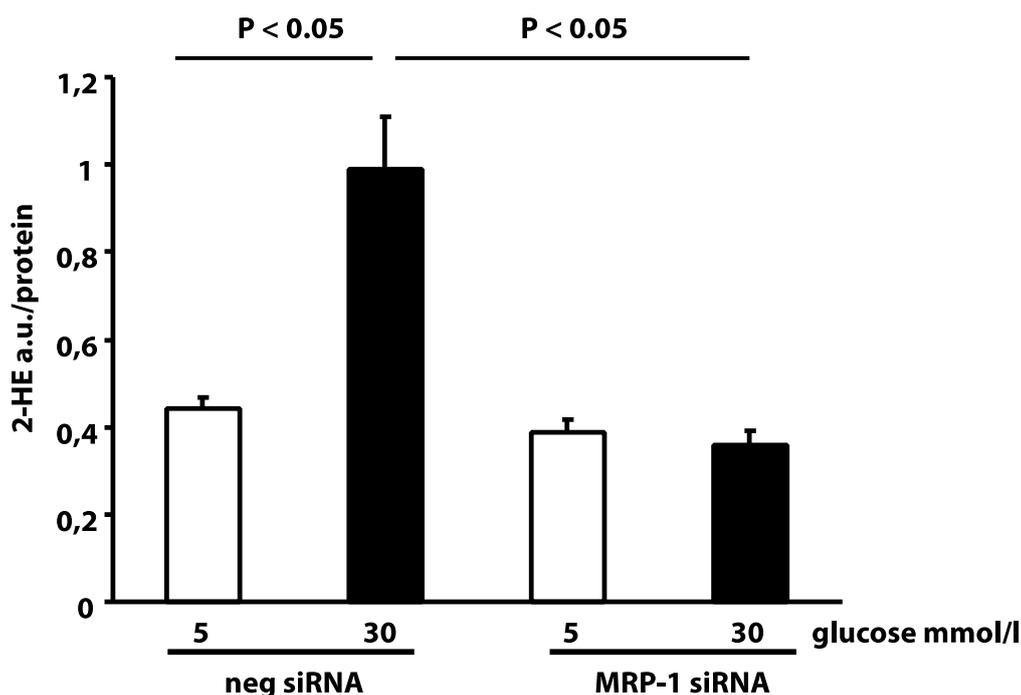


Abbildung 11: Produktion von Superoxidanionen, gemessen mittels DHE-HPLC, in HAECs, welche entweder mittels negativer siRNA oder siRNA gegen MRP-1 transfiziert worden sind und anschließend für fünf Tage entweder unter normalen Glukosekonzentrationen (5mmol/l) oder unter erhöhten Glukosekonzentrationen (30mmol/l) gehalten wurden. Mean ± SEM, n = 6-10

3.5 Glutathion-Spiegel

Bei der Messung der aortalen GSH-Spiegel wiesen beide nicht-diabetische Gruppen, Sham-Wildtyp-FVB und Sham-MRP-1^{-/-}, gleiche GSH-Werte auf.

STZ-induzierter Diabetes führte in der Gruppe der STZ-Wildtyp-FVB-Tiere, im Vergleich mit den nicht-diabetischen Tieren, zu signifikant erniedrigten GSH-Spiegeln.

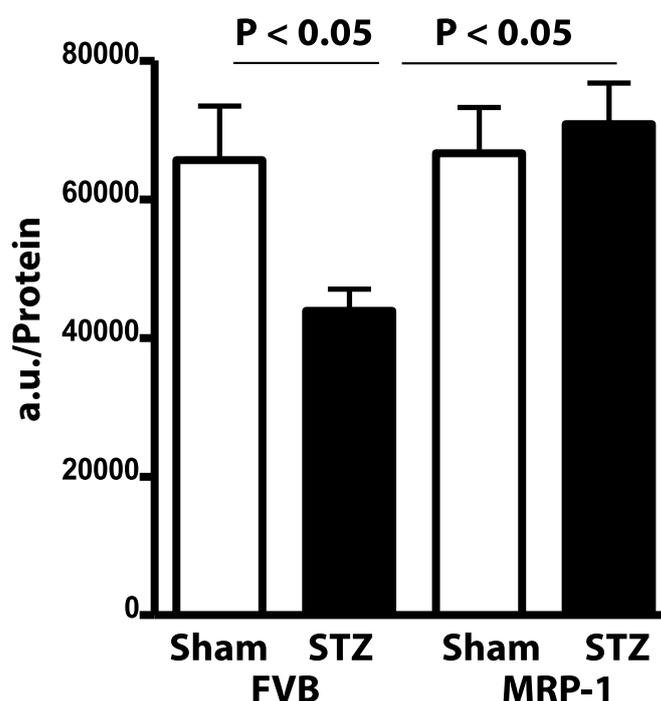


Abbildung 12: Aortale GSH-Spiegel, gemessen mittels HPLC unter Verwendung einer Brom-Diamantenelektrode acht Wochen nach Induktion von Diabetes mittels STZ-Injektionen oder Sham-Injektionen. Mean \pm SEM, n = 4

STZ-induzierter Diabetes hatte in der Gruppe der STZ-MRP-1^{-/-}-Tiere keinen Einfluss auf die vasikulären, aortalen GSH-Spiegel (Abbildung 12). Somit waren die GSH-Werte der diabetischen MRP-1^{-/-}-Tiere vergleichbar mit den nicht-diabetischen Tieren. Vergleicht man die STZ-Wildtyp-FVB Gruppe mit der STZ-MRP-1^{-/-}-Gruppe, so ergab sich auch hier eine signifikante Verringerung der aortalen GSH-Spiegel in der diabetischen Wildtyp-FVB-Gruppe.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des MRP-1-Transporters auf die vaskuläre Funktion und auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unter diabetischen Stoffwechselbedingungen untersucht.

Tiere, denen MRP-1 fehlt, entwickelten nach Injektion von STZ den gleichen Anstieg der Blutzuckerspiegel und unterlagen einem vergleichbaren Gewichtsverlauf wie FVB-Kontrolltiere. Das Fehlen des MRP-1-Transporters schützte jedoch vor der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion im Sinne einer fehlenden mangelhaften Relaxationsfähigkeit. Diabetische MRP-1^{-/-}-Tiere hatten eine weitgehend unauffällige endothelabhängige Relaxation und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in den Aorten. Das Fehlen von MRP-1 schützte sowohl vor einem Anstieg der Superoxidanion- als auch der Wasserstoffperoxid-Produktion. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der durch erhöhte Glukosespiegel induzierte Anstieg der Superoxidanion-Produktion in humanen aortalen Endothelzellen durch Herunterregulation von MRP-1 mittels siRNA verhindert wird. Unter diabetischen Stoffwechselbedingungen kam es zu einem Abfall der aortalen GSH-Konzentration. Das Fehlen von MRP-1 hingegen verhinderte diesen Abfall von GSH.

4.1 Tierversuch

Diabetes ist eine weltweit verbreitete Krankheit und stellt einen wesentlichen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Im Jahre 2011 litten etwa 366 Millionen Menschen weltweit an Diabetes. Bis 2030 wird ein Anstieg auf 552 Millionen erwartet [120, 121]. Die Forschung an Diabetes an sich und auch der Einsatz von Tiermodellen in der Diabetesforschung haben eine lange Geschichte. Bereits um 1880 wurden erste Versuche an Tiermodellen zur Erforschung des Diabetes durchgeführt. Diabetes wurde damals durch die Entfernung des Pankreas ausgelöst. Neben der Aufklärung der Pathogenese werden heutzutage nahezu alle neuen Behandlungsmethoden für Diabetes an Tiermodellen getestet [104].

Es existieren verschiedenste Tiermodelle zur Untersuchung der Pathophysiologie des Diabetes. In dieser Studie wurde Diabetes durch die Injektion von STZ ausgelöst. Hier kann man als Nachteil anführen, dass nur die Effekte des Fehlens von Insulin betrachtet werden können, nicht jedoch die Effekte der bei Typ-II-Diabetes entstehenden Insulinresistenz [122]. Dies ist allerdings von untergeordneter Bedeutung, da es in beiden Fällen zu erhöhten Glukosekonzentrationen kommt und die Effekte auf das Endothel, welches im Gegensatz zu anderen Körperzellen keine Möglichkeit hat die Glukoseaufnahme zu begrenzen [99], untersucht wurden. Einer möglichen Regeneration der β -Zellen [122] wurde dadurch entgegengewirkt, dass mehrere Blutzuckermessungen durchgeführt wurden, STZ bei Bedarf nachgespritzt wurde und dass der Blutzuckerspiegel vor Organentnahme erneut kontrolliert wurde. Als Vorteile der Diabetesinduktion mittels STZ ist neben den im Vergleich zu anderen Methoden geringeren Kosten auch die Tatsache zu nennen, dass es zu einem selektiven Absterben der insulinproduzierenden Zellen kommt und dass andere Funktionen des Pankreas nicht beeinträchtigt werden. Da es nach STZ-Behandlung noch zu einer residualen Insulinsekretion kommt, sind die Ketoazidose und deren Folgen, wie erhöhte Mortalität der Versuchstiere, relativ gering [122].

MRP-1^{-/-}-Mäuse entwickelten nach erfolgreicher Injektion von STZ die gleichen, erhöhten Blutzuckerwerte wie die diabetischen FVB-Kontrolltiere. Es zeigte sich außerdem ein vergleichbarer Gewichtsverlauf zwischen beiden diabetischen Versuchsgruppen. Die nicht-diabetischen MRP-1^{-/-}-Tiere und die nicht-diabetischen FVB-Tiere wiesen eine normale Gewichtsentwicklung und für Mäuse normale Blutzuckerwerte auf. Dies zeigt, dass das Fehlen von MRP-1 keinen Einfluss auf die Entwicklung eines STZ-induzierten Diabetes hat und dass die im Folgenden gezeigten Resultate nicht auf eine mögliche unzureichende oder unterschiedliche Induktion von Diabetes zurückzuführen sind.

4.2 Endotheliale Funktion

Schon seit Längerem ist bekannt, dass es bei Diabetes zu einer Beeinträchtigung der endothelabhängigen Relaxation von Blutgefäßen, also zu einer endothelialen Dysfunktion kommt [77, 83]. Diese Beeinträchtigung konnte sowohl im Tiermodell [77, 85], als auch am Menschen [78, 84] gezeigt werden. - Die Rolle von MRP-1 hierbei ist jedoch noch unklar.

Verglichen mit den nicht-diabetischen Kontrolltieren kommt es in der hier durchgeführten Versuchsreihe zu einer Verminderung der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit der Aorten diabetischer Wildtyp-FVB-Tiere. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Studien, wobei der Großteil dieser Studien den C57BL/6-Stamm und nicht den in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten FVB-Stamm untersuchten [77, 123-126]. Insgesamt werden FVB-Tiere, im Vergleich zu C57BL/6-Tiere, eher selten für Diabetesstudien herangezogen. Durante et al. beschrieben beispielsweise anhand von spontandiabetischen Ratten eine Beeinträchtigung der endothelabhängigen Relaxation der Aorten dieser diabetischen Ratten. Die Vasorelaxation wurde bei dieser Studie durch Acetylcholin ausgelöst [125]. Taylor et al. beobachteten bei Ratten, bei welchen Diabetes durch STZ-Injektionen ausgelöst wurde, eine Verminderung der acetylcholininduzierten Relaxation von Mesenterialarterien [126].

Bei diabetischen MRP-1^{-/-}-Tieren kam es hier hingegen nicht zu einer Verminderung der vaskulären Relaxationsfähigkeit. Die Tiere der diabetischen MRP-1^{-/-}-Gruppe weisen die gleichen Relaxationskurven wie nicht-diabetische Mäuse auf. Somit wies die diabetische FVB-Gruppe eine, gegenüber allen anderen drei Versuchsgruppen, signifikante Beeinträchtigung der endothelialen Funktion auf.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den beobachteten Effekten wirklich um einen endothelvermittelten Mechanismus handelt, wurde die endothelunabhängige Relaxation mithilfe des NO-Donors DEA-NONOate geprüft. Es zeigten sich hierbei

keinerlei Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Vorarbeiten anderer Gruppen [125, 126].

4.3 Reaktive Sauerstoffspezies in murinen Aorten

Es existiert ein Zusammenhang zwischen verminderter endothelabhängiger Relaxation und einer Erhöhung der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen oder Wasserstoffperoxid. Beides tritt sowohl bei Diabetes als auch bei hohen Glukosekonzentrationen auf [91, 127]. Shi et al. beschreiben die Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies sogar als Schlüsselpathologie bei der bei Diabetes auftretenden endothelialen Dysfunktion [127]. Eine Modulation der vaskulären Superoxidanion-Produktion könnte den Erhalt der endothelialen Funktion in MRP-1^{-/-}-Mäusen erklären.

Guzik et al. beschrieben eine Erhöhung der Produktion des Superoxidanions bei Patienten mit Diabetes sowohl in Arterien als auch in Venen [93]. Gleiches wurde auch schon im Tierversuch festgestellt [110, 128]. Bei durch STZ-ausgelösten Diabetes kommt es zu einer Erhöhung der Superoxidanion-Produktion in Ratten [129].

In der hier durchgeführten Arbeit kam es ebenfalls zu einer Erhöhung der basalen Produktion des Superoxidanions bei diabetischen FVB-Tieren. Bei der diabetischen MRP-1^{-/-}-Gruppe zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Superoxidanion-Spiegel. Dieser signifikante Unterschied zur diabetischen Wildtyp-FVB-Gruppe weist auf die mögliche Einflussnahme von MRP-1 auf die vaskuläre Funktion bei Diabetes hin. Dieser Effekt von MRP-1 wurde bereits für durch Angiotensin II induzierte Hypertonie von Widder et al. beschreiben [110].

Neben Superoxidanionen trägt auch Wasserstoffperoxid zur endothelialen Dysfunktion bei [91, 127]. Ebenso kommt es bei durch STZ-induzierten Diabetes zu einer Erhöhung des Hydroxy-Radikals, einem Folgeprodukt von Wasserstoffperoxid [130].

Hier zeigte sich eine Erhöhung der basalen Wasserstoffperoxid Mengen in der diabetischen Wildtyp-FVB-Gruppe. Dies ist somit mit dem aktuellen

Erkenntnisstand, dass es bei Diabetes zu einer Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies kommt, vereinbar. Die Messung von Wasserstoffperoxid in der Gruppe der diabetischen MRP-1^{-/-}-Tiere bestätigte die Ergebnisse der Superoxid-Bestimmung in dieser Versuchsgruppe. Auch traten, im Vergleich zu den nicht-diabetischen Versuchsgruppen, normale Wasserstoffperoxid-Werte auf. Somit kam es ausschließlich in der diabetischen Wildtyp-FVB-Gruppe, nicht jedoch bei den hyperglykämischen MRP-1^{-/-}-Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid. Die in-vitro-Versuche mit HAECs zeigten ebenso, dass es zu einer erhöhten Produktion von Superoxidanionen kommt, wenn die Endothelzellen unter Glukosekonzentrationen von 30mmol/l gehalten wurden. Die Herabregulation von MRP-1 mittels siRNA verhinderte jedoch den Anstieg der Superoxidanionen und bestätigte somit, dass es sich um ein glukoseinduziertes Phänomen handelt.

Die Zusammenschau aus den Ergebnissen der Bestimmung der endothelialen Funktion, gemessen anhand der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit, und den Spiegeln der reaktiven Sauerstoffspezies lässt somit den Schluss zu, dass MRP-1 eine wichtige Rolle bei dem durch Diabetes ausgelösten oxidativen Stress und der konsekutiven endothelialen Dysfunktion spielt. Dies erhärtet die These, dass das Fehlen bzw. die Herabregulation von MRP-1 einen protektiven Einfluss auf die Gefäßfunktion bei Diabetes oder Hyperglykämie hat. Dieser Zusammenhang findet sich auch bei Hypertonie [110].

4.4 Vaskuläres Glutathion

Erniedrigte vaskuläre GSH-Werte sind bei diabetischen STZ-Mäusen vorbeschrieben [97]. Es ist bekannt, dass es unter diabetischen Stoffwechselbedingungen zu einer Verminderung des GSH-Spiegels kommt, wobei dieser Abfall die endotheliale Dysfunktion und die erhöhten reaktiven Sauerstoffspezies erklären könnte. Diese verminderten GSH-Spiegel bei Diabetes wurden in den verschiedensten Organen gefunden [131]. Loven et al. beschrieben beispielsweise eine Verminderung von GSH in der Leber von Sprague-Dawley Ratten, bei welchen Diabetes mittels STZ ausgelöst wurde [132]. Die

Verminderung von GSH in humanen Erythrozyten bei diabetischen Stoffwechselbedingungen ist auch beim Menschen beschrieben [133].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt ebenfalls bei diabetischen Wildtyp-FVB-Mäusen beobachtet werden. Der Erhalt des vaskulären GSH-Spiegels trägt zu den bei MRP-1^{-/-}-Tieren auftretenden positiven Effekten auf die endotheliale Funktion bei. Ähnliches wurde wiederum bereits für Bluthochdruck beschrieben [110].

Das Fehlen von MRP-1 verhindert somit den Verlust von aortalem GSH unter einer diabetischer Stoffwechsellaage und wahrscheinlich hierdurch kommt es zu einer verminderten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies mit Erhalt der vaskulären Relaxationsfähigkeit.

Die Beobachtung, dass der Erhalt des GSH-Spiegels, einem bedeutenden Antioxidans, zu positiven Effekten auf die Gefäßfunktion führt, wird durch Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigt. Cameron et al. beschreiben beispielsweise, dass reaktive Sauerstoffspezies Abnormitäten des vaskulären Endothels hervorrufen, welche durch Antioxidantien vermeidbar sind [134]. Weitere experimentelle und klinische Daten führen zu der Vermutung, dass die Substitution mit Antioxidantien wie Vitamin E oxidativen Stress bei Diabetes normalisiert und die endothelabhängige Vasodilatation verbessern könnten [135]. Neri et al. zeigen, dass es durch die Gabe verschiedener Antioxidantien zu einer Reduktion von oxidativem Stress bei gesunden Individuen und bei Patienten mit beeinträchtigter Glukosetoleranz kommt [136].

Das Redoxgleichgewicht zwischen GSH und GSSG ist wichtig für die Integrität des Endothels bzw. der Zellen [35, 36]. Bei oxidativem Stress wird dieses Gleichgewicht beeinträchtigt [137]. Zur Aufrechterhaltung des GSH/GSSG-Gleichgewichtes stehen der Zelle verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Für die Reaktion auf oxidativen Stress sind zwei Wege dominierend. Einerseits wird GSSG mit Hilfe der GSH-Reduktase zu GSH reduziert und steht so wieder der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies zur Verfügung [27]. Andererseits wird GSSG zur Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichtes durch MRP-1 aus den Zellen

exportiert. In humanen Aorten-Endothelzellen stellt MRP-1 den Hauptexportmechanismus von GSSG dar [24, 25].

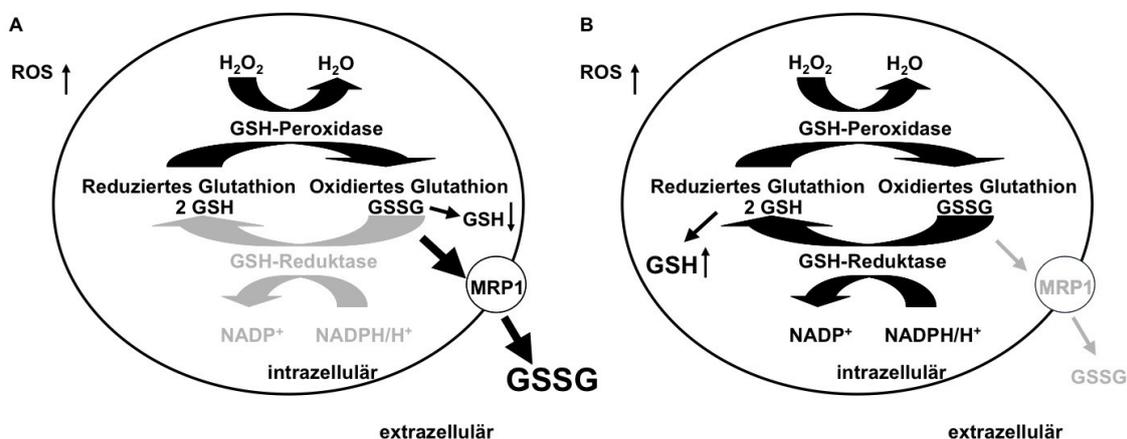


Abbildung 13: MRP-1 und Glutathion bei oxidativem Stress nach [25]. A illustriert den intrazellulären Ablauf der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies bei Anwesenheit von MRP-1. B zeigt die vorherrschenden Abläufe bei einer Herunterregulation vom MRP-1.

MRP-1 spielt im Stoffwechsel von GSH und bei oxidativem Stress, welcher auch unter diabetischen Bedingungen auftritt, eine wichtige Rolle (Abbildung 13 A). Für Hypertonie, einer Pathologie die ebenfalls mit erhöhten Spiegeln an reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht [138, 139], wurden bereits weitergehende Untersuchungen durchgeführt. Allgemein gesehen wird durch eine Erhöhung der Menge an Antioxidantien eine Verbesserung der endothelialen Funktion erreicht [109]. Es zeigen sich auch Auswirkungen auf die endotheliale Funktion, wenn das MRP-1-Protein blockiert oder im Versuch depletiert wird. Normalerweise kommt es zu einem Abfall des NO-Spiegels durch eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies bei Hypertonie. Dies wird bei einer Blockade des MRP-1-Proteins verhindert (Abbildung 13 B). Gleichermäßen verhält es sich mit den zellulären GSH-Spiegeln. Eine Blockade des MRP-1-Proteins führt zu gleichbleibenden GSH-Spiegeln [110, 140]

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen anhand der verbesserten Endothelfunktion und den geringeren Spiegeln reaktiver Sauerstoffspezies bei Diabetes vermuten, dass der Weg der Wiederherstellung von GSH mittels der GSH-Reduktase für Endothelzellen die in Summe profitablere Möglichkeit ist. Das, was hier für Diabetes beschrieben ist, wird von Widder et al. für Bluthochdruck [110]

und von Mueller et al. für oxidativen Stress durch oszillierende Schubspannung [25, 140] beschrieben. Der Export von GSSG durch MRP-1 mag für die Zelle an sich kurzfristig ein gutes Ergebnis darstellen, längerfristig jedoch, so wie es bei Diabetes oder Hypertonie auftritt, ist dieser Export von Nachteil für beispielsweise Endothelzellen und somit für den gesamten Organismus. Interessanterweise kommt es bei STZ-induziertem Diabetes bei Ratten zu einer Erhöhung der Expression und der Aktivität von MRP-1. Bei diesen Versuchstieren führte der Einsatz eines MRP-1-Inhibitors zu erhöhten GSH-Spiegeln. Dies lässt somit vermuten, dass MRP-1 nicht nur in der Aorta den GSH-Spiegel während diabetischer Stoffwechselbedingungen, sondern auch in anderen Organen reguliert [141].

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Verlust von MRP-1 bzw. das Fehlen von MRP-1 in aortalen Endothelzellen zum Erhalt der endothelialen Funktion unter diabetischen Stoffwechselbedingungen beiträgt. MRP-1 könnte ein mögliches neues Ziel in der Therapie der vaskulären Komplikationen bei Diabetes darstellen.

5 Zusammenfassung

An Diabetes leiden momentan weltweit ca. 366 Millionen Menschen. Vaskuläre Komplikationen wie Atherosklerose sind bei Diabetikern weit verbreitet. Eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies trägt zu einer Dysfunktion des Endothels bei Diabetes und hohen Glukosespiegeln bei. Glutathion (GSH) ist das häufigste zelluläre Thiol und stellt ein bedeutendes Antioxidans des menschlichen Organismus dar. Das Multidrug Resistance Protein-1 (MRP-1) ist im Endothel der Haupttransporter von oxidiertem GSH. Blockiert man MRP-1, so wird unter oxidativem Stress der intrazelluläre GSH-Spiegel erhalten.

In dieser Arbeit wird der Einfluss von MRP-1 auf die endotheliale Funktion und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies bei Diabetes und erhöhten Glukosespiegeln anhand von MRP-1^{-/-}-Mäusen und Wildtyp-FVB-Tieren untersucht.

Acht Wochen nach Injektion von STZ wurde die endothelabhängige Vasorelaxation an den isolierten thorakalen Aorten bestimmt. Diabetische Wildtyp-Tiere wiesen eine signifikant verminderte endothelabhängige Vasorelaxation auf. In MRP-1^{-/-}-Tieren hingegen kam es zu keiner Beeinträchtigung der Endothelfunktion. Die endothelunabhängige Vasorelaxation war nicht signifikant unterschiedlich. STZ-induzierter Diabetes führte zu einer signifikant erhöhten Produktion von Superoxidanionen sowie Wasserstoffperoxid in Wildtyp-Tieren. Diabetische MRP-1^{-/-}-Mäuse hingegen zeigten keinen Anstieg der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Erhöhte Glukosekonzentrationen führten in vitro in humanen aortalen Endothelzellen ebenso zur erhöhten Superoxidanion-Produktion. In Zellen, in denen MRP-1 mittels siRNA herunterreguliert war, zeigte sich keine Erhöhung von Superoxidanionen. In Wildtyp-Mäusen führte Diabetes zu einer Verminderung des vaskulären GSH-Spiegels, wohingegen bei MRP-1^{-/-}-Tieren keine Veränderung auftrat.

Diese Daten weisen auf die wichtige Rolle von MRP-1 bei der unter hohen Glukosekonzentrationen auftretenden endothelialen Dysfunktion hin. MRP-1 stellt

somit einen neuen Ansatzpunkt in der Behandlung der durch Diabetes ausgelösten vaskulären Dysfunktion dar.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenhänge zwischen GSH und MRP-1	4
Abbildung 2: Strukturformel von Glutathion	5
Abbildung 3: Superoxidanion als Ausgangspunkt oxidativer Schäden.....	11
Abbildung 4: Strukturformel von Streptozotocin.....	23
Abbildung 5: Gewichtsänderung der Versuchstiere.....	30
Abbildung 6: Blutzuckerspiegel der Versuchstiere.....	31
Abbildung 7: Endothelabhängige, Acetylcholin vermittelte Vasorelaxation	32
Abbildung 8: Endothelunabhängige, DEA-NONOate vermittelte Vasorelaxation.	33
Abbildung 9: Aortale Produktion von Superoxidanionen	34
Abbildung 10: Aortale Wasserstoffperoxid-Spiegel	35
Abbildung 11: Produktion von Superoxidanionen	36
Abbildung 12: Aortale GSH-Spiegel	37
Abbildung 13: MRP-1 und Glutathion bei oxidativem Stress	44

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter	ATP Binding Cassette-Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
DHE	Dihydroethidium
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
EDRF.....	endothelial derived relaxing factor
EDTACa	Ethylendiamintetraessigsäure-Calcium
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FAD.....	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAEC	Humane Aorten Endothelzelle
HClO ₄	Perchlorsäure
HO ₂	Hydroperoxyl-Radikal
HPLC.....	High performance liquid chromatography
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
K ₂ HPO ₄	Dikaliumphosphat

KCl	Kaliumchlorid
LTC ₄	Leukotrien C4
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MRP-1	Multidrug Resistance Protein-1
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH•	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PGF ₂ α	Prostaglandin 2α
RNA	Ribonukleinsäure
siRNA	Small interfering RNA
STZ	Streptozotocin
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

6.3 Literaturverzeichnis

1. Cole, S.P., et al., *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line*. Science, 1992. **258**(5088): p. 1650-4.
2. Borst, P., et al., *The multidrug resistance protein family*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 347-57.
3. Kruh, G.D. and M.G. Belinsky, *The MRP family of drug efflux pumps*. Oncogene, 2003. **22**(47): p. 7537-52.
4. Evers, R., et al., *Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells*. J Clin Invest, 1996. **97**(5): p. 1211-8.
5. Cole, S.P., et al., *Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells*. Cancer Res, 1994. **54**(22): p. 5902-10.
6. Bakos, E. and L. Homolya, *Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1)*. Pflugers Arch, 2007. **453**(5): p. 621-41.
7. Breuninger, L.M., et al., *Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5342-7.
8. Zaman, G.J., et al., *The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(19): p. 8822-6.
9. Wijnholds, J., et al., *Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 797-808.

10. Wijnholds, J., et al., *Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein*. Nat Med, 1997. **3**(11): p. 1275-9.
11. Ros, J.E., et al., *High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease*. J Pathol, 2003. **200**(5): p. 553-60.
12. Brechot, J.M., et al., *Different pattern of MRP localization in ciliated and basal cells from human bronchial epithelium*. J Histochem Cytochem, 1998. **46**(4): p. 513-7.
13. Peng, K.C., et al., *Tissue and cell distribution of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in mouse intestine and kidney*. J Histochem Cytochem, 1999. **47**(6): p. 757-68.
14. Zhang, Y., et al., *Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **311**(2): p. 449-55.
15. Sugiyama, D., et al., *Involvement of multidrug resistance associated protein 1 (Mrp1) in the efflux transport of 17beta estradiol-D-17beta-glucuronide (E217betaG) across the blood-brain barrier*. Pharm Res, 2003. **20**(9): p. 1394-400.
16. St-Pierre, M.V., et al., *Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **279**(4): p. R1495-503.
17. Tribull, T.E., R.H. Bruner, and L.J. Bain, *The multidrug resistance-associated protein 1 transports methoxychlor and protects the seminiferous epithelium from injury*. Toxicol Lett, 2003. **142**(1-2): p. 61-70.

18. Cole, S.P. and R.G. Deeley, *Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(8): p. 438-46.
19. Schneider, E., et al., *Buthionine sulphoximine-mediated sensitisation of etoposide-resistant human breast cancer MCF7 cells overexpressing the multidrug resistance-associated protein involves increased drug accumulation*. Br J Cancer, 1995. **71**(4): p. 738-43.
20. Qian, Y.M., et al., *Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6404-11.
21. Lorico, A., et al., *Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione*. Cancer Res, 1997. **57**(23): p. 5238-42.
22. Loe, D.W., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1)*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(2): p. 530-8.
23. Leier, I., et al., *ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump*. Biochem J, 1996. **314 (Pt 2)**: p. 433-7.
24. Hirrlinger, J., et al., *The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress*. J Neurochem, 2001. **76**(2): p. 627-36.
25. Mueller, C.F., et al., *The role of the multidrug resistance protein-1 in modulation of endothelial cell oxidative stress*. Circ Res, 2005. **97**(7): p. 637-44.
26. Yamane, Y., et al., *Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31075-85.

27. Dickinson, D.A. and H.J. Forman, *Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **973**: p. 488-504.
28. Löffler, G., et al., *Biochemie und Pathobiochemie : mit 192 Tabellen ; [+ online specials]*. 8., völlig neu bearb. Aufl. ed. Springer-Lehrbuch. 2007, Heidelberg: Springer Medizin. XXI, 1263 S.
29. Hammond, C.L., T.K. Lee, and N. Ballatori, *Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes*. J Hepatol, 2001. **34**(6): p. 946-54.
30. Ballatori, N. and A.T. Truong, *Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation*. Am J Physiol, 1992. **263**(5 Pt 1): p. G617-24.
31. Urata, Y., et al., *Long exposure to high glucose concentration impairs the responsive expression of gamma-glutamylcysteine synthetase by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in mouse endothelial cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 15146-52.
32. Cohen, G. and P. Hochstein, *Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes*. Biochemistry, 1963. **2**: p. 1420-8.
33. Ketterer, B., *The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism*. Drug Metab Rev, 1982. **13**(1): p. 161-87.
34. Arrigo, A.P., *Gene expression and the thiol redox state*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(9-10): p. 936-44.
35. Chiba, T., et al., *Fas-mediated apoptosis is modulated by intracellular glutathione in human T cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(5): p. 1164-9.

36. Celli, A., et al., *Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 1): p. G749-57.
37. Trompier, D., et al., *Verapamil and its derivative trigger apoptosis through glutathione extrusion by multidrug resistance protein MRP1*. Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4950-6.
38. Jones, D.P., *Radical-free biology of oxidative stress*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(4): p. C849-68.
39. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
40. Augustin, A.J., *[Oxidative tissue damage]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2010. **227**(2): p. 90-8.
41. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
42. Umeki, S., *Activation factors of neutrophil NADPH oxidase complex*. Life Sci, 1994. **55**(1): p. 1-13.
43. Fatehi-Hassanabad, Z., C.B. Chan, and B.L. Furman, *Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes*. Eur J Pharmacol, 2010. **636**(1-3): p. 8-17.
44. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
45. Versari, D., et al., *Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(4): p. 527-36.

46. Feletou, M., R. Kohler, and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets*. *Curr Hypertens Rep*, 2010. **12**(4): p. 267-75.
47. Rubanyi, G.M. and P.M. Vanhoutte, *Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor*. *Am J Physiol*, 1986. **250**(5 Pt 2): p. H822-7.
48. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. *Eur Heart J*, 2011.
49. Mayer, B., M. John, and E. Bohme, *Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin*. *FEBS Lett*, 1990. **277**(1-2): p. 215-9.
50. Pollock, J.S., et al., *Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(23): p. 10480-4.
51. Lorsbach, R.B., et al., *Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(3): p. 1908-13.
52. Fleming, I. and R. Busse, *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. **284**(1): p. R1-12.
53. Widder, J.D., et al., *Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis by shear stress*. *Circ Res*, 2007. **101**(8): p. 830-8.
54. Rask-Madsen, C. and G.L. King, *Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. **3**(1): p. 46-56.

55. Knowles, R.G., et al., *Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 5159-62.
56. Forstermann, U., et al., *Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries*. Circ Res, 1986. **58**(4): p. 531-8.
57. Furchgott, R.F., et al., *Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries*. J Cardiovasc Pharmacol, 1984. **6 Suppl 2**: p. S336-43.
58. Rapoport, R.M. and F. Murad, *Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP*. Circ Res, 1983. **52**(3): p. 352-7.
59. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation*. Nature, 1983. **306**(5939): p. 174-6.
60. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13176-81.
61. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
62. Cohen, R.A. and X. Tong, *Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **55**(4): p. 308-16.
63. Mueller, C.F., et al., *ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 274-8.

64. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
65. Bauersachs, J. and J.D. Widder, *Tetrahydrobiopterin, endothelial nitric oxide synthase, and mitochondrial function in the heart*. Hypertension, 2009. **53**(6): p. 907-8.
66. Brunner, H., et al., *Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension*. J Hypertens, 2005. **23**(2): p. 233-46.
67. Bauersachs, J. and J.D. Widder, *Endothelial dysfunction in heart failure*. Pharmacol Rep, 2008. **60**(1): p. 119-26.
68. Vallance, P., J. Collier, and S. Moncada, *Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man*. Lancet, 1989. **2**(8670): p. 997-1000.
69. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
70. Irani, K., *Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling*. Circ Res, 2000. **87**(3): p. 179-83.
71. Bruder, G., E.D. Jarasch, and H.W. Heid, *High concentrations of antibodies to xanthine oxidase in human and animal sera. Molecular characterization*. J Clin Invest, 1984. **74**(3): p. 783-94.
72. Waud, W.R. and K.V. Rajagopalan, *The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O)*. Arch Biochem Biophys, 1976. **172**(2): p. 365-79.

73. Node, K., et al., *Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids*. Science, 1999. **285**(5431): p. 1276-9.
74. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
75. Griendling, K.K. and M. Ushio-Fukai, *NADH/NADPH Oxidase and Vascular Function*. Trends Cardiovasc Med, 1997. **7**(8): p. 301-7.
76. Pagano, P.J., et al., *Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14483-8.
77. Mayhan, W.G., *Impairment of endothelium-dependent dilatation of cerebral arterioles during diabetes mellitus*. Am J Physiol, 1989. **256**(3 Pt 2): p. H621-5.
78. Watts, G.F., et al., *Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia*. Clin Sci (Lond), 1996. **91**(5): p. 567-73.
79. Lekakis, J., et al., *Endothelial dysfunction of conduit arteries in insulin-dependent diabetes mellitus without microalbuminuria*. Cardiovasc Res, 1997. **34**(1): p. 164-8.
80. Edgley, A.J., et al., *In vivo regulation of endothelium-dependent vasodilation in the rat renal circulation and the effect of streptozotocin-induced diabetes*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **295**(3): p. R829-39.
81. Stehouwer, C.D., et al., *Urinary albumin excretion, cardiovascular disease, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Lancet, 1992. **340**(8815): p. 319-23.

82. Balletshofer, B.M., et al., *Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance*. *Circulation*, 2000. **101**(15): p. 1780-4.
83. Calver, A., J. Collier, and P. Vallance, *Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes*. *J Clin Invest*, 1992. **90**(6): p. 2548-54.
84. McVeigh, G.E., et al., *Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 1992. **35**(8): p. 771-6.
85. De Vriese, A.S., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes*. *Br J Pharmacol*, 2000. **130**(5): p. 963-74.
86. Schalkwijk, C.G. and C.D. Stehouwer, *Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction*. *Clin Sci (Lond)*, 2005. **109**(2): p. 143-59.
87. Williams, S.B., et al., *Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo*. *Circulation*, 1998. **97**(17): p. 1695-701.
88. Morcos, M., et al., *Effect of alpha-lipoic acid on the progression of endothelial cell damage and albuminuria in patients with diabetes mellitus: an exploratory study*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2001. **52**(3): p. 175-83.
89. Kedziora-Kornatowska, K., et al., *Effect of vitamin E and vitamin C supplementation on antioxidative state and renal glomerular basement membrane thickness in diabetic kidney*. *Nephron Exp Nephrol*, 2003. **95**(4): p. e134-43.
90. Beckman, J.A., et al., *Inhibition of protein kinase C β prevents impaired endothelium-dependent vasodilation caused by hyperglycemia in humans*. *Circ Res*, 2002. **90**(1): p. 107-11.

91. Hink, U., et al., *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. *Circ Res*, 2001. **88**(2): p. E14-22.
92. Inoguchi, T., et al., *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells*. *Diabetes*, 2000. **49**(11): p. 1939-45.
93. Guzik, T.J., et al., *Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2002. **105**(14): p. 1656-62.
94. Lopez-Lopez, J.G., et al., *Diabetes induces pulmonary artery endothelial dysfunction by NADPH oxidase induction*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. **295**(5): p. L727-32.
95. Ding, H., M. Aljofan, and C.R. Triggle, *Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells*. *J Cell Physiol*, 2007. **212**(3): p. 682-9.
96. Mugge, A., et al., *Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity*. *Am J Physiol*, 1991. **260**(2 Pt 1): p. C219-25.
97. Alp, N.J., et al., *Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(5): p. 725-35.
98. Mollnau, H., et al., *Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling*. *Circ Res*, 2002. **90**(4): p. E58-65.
99. Kaiser, N., et al., *Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells*. *Diabetes*, 1993. **42**(1): p. 80-9.

100. Rakieten, N., M.L. Rakieten, and M.V. Nadkarni, *Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)*. Cancer Chemother Rep, 1963. **29**: p. 91-8.
101. Junod, A., et al., *Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response*. J Clin Invest, 1969. **48**(11): p. 2129-39.
102. Schein, P.S., et al., *Clinical antitumor activity and toxicity of streptozotocin (NSC-85998)*. Cancer, 1974. **34**(4): p. 993-1000.
103. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
104. Rees, D.A. and J.C. Alcolado, *Animal models of diabetes mellitus*. Diabet Med, 2005. **22**(4): p. 359-70.
105. Herr, R.R., J.K. Jahnke, and A.D. Argoudelis, *The structure of streptozotocin*. J Am Chem Soc, 1967. **89**(18): p. 4808-9.
106. Hosokawa, M., W. Dolci, and B. Thorens, *Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing beta cells to streptozotocin*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(5): p. 1114-7.
107. Dufrane, D., et al., *Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity*. Transplantation, 2006. **81**(1): p. 36-45.
108. Bolzan, A.D. and M.S. Bianchi, *Genotoxicity of streptozotocin*. Mutat Res, 2002. **512**(2-3): p. 121-34.
109. Widder, J.D., et al., *Attenuation of angiotensin II-induced vascular dysfunction and hypertension by overexpression of Thioredoxin 2*. Hypertension, 2009. **54**(2): p. 338-44.

110. Widder, J.D., et al., *Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensin II*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(4): p. 762-8.
111. Kojda, G., et al., *Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control*. *Cardiovasc Res*, 1999. **42**(1): p. 206-13.
112. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
113. Freiman, P.C., et al., *Atherosclerosis impairs endothelium-dependent vascular relaxation to acetylcholine and thrombin in primates*. *Circ Res*, 1986. **58**(6): p. 783-9.
114. Laurindo, F.R., D.C. Fernandes, and C.X. Santos, *Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products*. *Methods Enzymol*, 2008. **441**: p. 237-60.
115. Fraccarollo, D., et al., *Deletion of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor ameliorates adverse remodeling after myocardial infarction*. *Circulation*, 2011. **123**(4): p. 400-8.
116. Fink, B., et al., *Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(4): p. C895-902.
117. Hubertus, K.V. *Sensitive Messung von Superoxidanionen in kardiovaskulären Geweben*. [Würzburg, Univ., Diss., 2012. - online]; Available from: URN: urn:nbn:de:bvb:20-opus-70162; URL: <http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/volltexte/2012/7016/>.

118. Zhou, M., et al., *A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases*. *Anal Biochem*, 1997. **253**(2): p. 162-8.
119. Invitrogen. *Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*. 2009 [cited 2012 20 July]; Available from: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp22188.pdf>.
120. Tabak, A.G., et al., *Prediabetes: a high-risk state for diabetes development*. *Lancet*, 2012. **379**(9833): p. 2279-90.
121. IDF. *International Diabetes Federation - The Global Burden*. 2011 [cited 2012 10 August]; Available from: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>.
122. Srinivasan, K. and P. Ramarao, *Animal models in type 2 diabetes research: an overview*. *Indian J Med Res*, 2007. **125**(3): p. 451-72.
123. Oniki, H., et al., *Effects of the Superoxide Dismutase Mimetic Tempol on Impaired Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Relaxations in Type II Diabetic Rats*. *Clin Exp Hypertens*, 2012.
124. Nassar, T., et al., *Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats*. *Eur J Pharmacol*, 2002. **436**(1-2): p. 111-8.
125. Durante, W., A.K. Sen, and F.A. Sunahara, *Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats*. *Br J Pharmacol*, 1988. **94**(2): p. 463-8.
126. Taylor, P.D., et al., *Endothelium-dependent relaxation and noradrenaline sensitivity in mesenteric resistance arteries of streptozotocin-induced diabetic rats*. *Br J Pharmacol*, 1992. **107**(2): p. 393-9.

127. Shi, Y. and P.M. Vanhoutte, *Reactive oxygen-derived free radicals are key to the endothelial dysfunction of diabetes*. J Diabetes, 2009. **1**(3): p. 151-62.
128. Serpillon, S., et al., *Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(1): p. H153-62.
129. Pernomian, L., et al., *The role of reactive oxygen species in the modulation of the contraction induced by angiotensin II in carotid artery from diabetic rat*. Eur J Pharmacol, 2012. **678**(1-3): p. 15-25.
130. Ohkuwa, T., Y. Sato, and M. Naoi, *Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocin*. Life Sci, 1995. **56**(21): p. 1789-98.
131. Maritim, A.C., R.A. Sanders, and J.B. Watkins, 3rd, *Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review*. J Biochem Mol Toxicol, 2003. **17**(1): p. 24-38.
132. Loven, D., et al., *Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes*. Diabetes, 1986. **35**(5): p. 503-7.
133. Murakami, K., et al., *Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus*. Metabolism, 1989. **38**(8): p. 753-8.
134. Cameron, N.E. and M.A. Cotter, *Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 1999. **45**(2-3): p. 137-46.
135. Laight, D.W., M.J. Carrier, and E.E. Anggard, *Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 457-64.

136. Neri, S., et al., *Effects of antioxidants on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction in subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes*. Eur J Nutr, 2010. **49**(7): p. 409-16.
137. Spector, A., R.R. Huang, and G.M. Wang, *The effect of H₂O₂ on lens epithelial cell glutathione*. Curr Eye Res, 1985. **4**(12): p. 1289-95.
138. Touyz, R.M. and A.M. Briones, *Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension*. Hypertens Res, 2011. **34**(1): p. 5-14.
139. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, *Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension*. Histochem Cell Biol, 2004. **122**(4): p. 339-52.
140. Mueller, C.F., et al., *Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C₄ export*. Circulation, 2008. **117**(22): p. 2912-8.
141. Quezada, C., et al., *Increased expression of the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) in kidney glomeruli of streptozotocin-induced diabetic rats*. Biol Chem, 2011. **392**(6): p. 529-37.

Danksagung

An dieser Stelle danke ich herzlich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. J. Widder für die Möglichkeit der Bearbeitung des Themas sowie die ausgezeichnete wissenschaftliche Unterstützung und die überaus hilfsbereite und freundliche Betreuung.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Team der Arbeitsgruppe des Labors von Prof. Dr. med. J. Bauersachs, ohne deren fachliche und technische Unterstützung das Zustandekommen und die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. G. Ertl, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Klinik anfertigen zu können.

Abschließend danke ich besonders meiner Familie und Anna für die moralische Unterstützung.